

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年4月8日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029242 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/02, 9/64, 5/10,
C07K 16/40, C12P 21/08, A61K 38/43, 39/395, A61P
7/02, G01N 33/532, 33/573, 33/577

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012280

(22) 国際出願日: 2003年9月25日 (25.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-279924 2002年9月25日 (25.09.2002) JP
特願2002-377569
2002年12月26日 (26.12.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県 熊
本市大塚一丁目6番1号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 副島 見事 (SOE-
JIMA, Kenji) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志
村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法
研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 三村 のり子
(MIMURA, Noriko) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡
旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清
療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 前田 浩
明 (MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池
郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清
療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 野崎 周英
(NOZAKI, Chikateru) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清
療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 濱本 高義
(HAMAMOTO, Takayoshi) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県
熊本市大塚一丁目6番1号 財団法人化学及血清療法
研究所内 Kumamoto (JP). 中垣 智弘 (NAKAGAKI, To-
mohiro) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡旭志村川
辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊
池研究所内 Kumamoto (JP).(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル 3階 Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: ANTIBODY AGAINST ENZYME SPECIFICALLY CLEAVING VON VILLEBRAND FACTOR AND ASSAY SYS-
TEM USING THE SAME

(54) 発明の名称: フォンビルブランド因子特異的切断酵素に対する抗体及びそれを用いたアッセイ系

(57) Abstract: It is intended to provide an antibody showing a selective immunoreactivity for ADAMTS-13 and employ this anti-
body in epitope analysis or diagnosis of an ADAMTS-13 autoantibody-positive patient. Moreover, it is intended to provide a process
for producing a modified ADAMTS-13 molecule having a partial deletion aiming at the application thereof to drugs and use thereof.
Namely, an antibody specific for ADAMTS-13 which can be obtained from a warm-blooded animal immunologically sensitized
with a polypeptide containing the whole ADAMTS-13 amino acid sequence or a part thereof; a process for producing an antibody
involving the step of immunologically sensitizing a warm-blooded animal with a polypeptide containing the whole ADAMTS-13
amino acid sequence or a part thereof; use of the above-described antibody involving a method of detecting ADAMTS-13 and a
purification method; and a modified ADAMTS-13 molecule having a partial deletion.(57) 要約: ADAMTS-13に対して選択的に免疫反応性を示す抗体の提供並びに当該抗体のエピトープ解析または
ADAMTS-13自己抗体陽性患者の診断への利用を目的とした。あるいは医薬品としての利用を目的とした部分欠失
ADAMTS-13改変分子の製造方法及び用途を提供する。ADAMTS-13のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペ
プチドで免疫感作した温血動物から得ることができるADAMTS-13に特異的な抗体。ADAMTS-13のアミノ酸配列の
一部または全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程を含む抗体の製造方法。ADAMTS-13の検出方
法及び精製方法を含む当該抗体の用途並びに部分欠失ADAMTS-13改変分子を提供することよりなる。

明細書

フォンビルブランド因子特異的切断酵素に対する抗体及びそれを用いたアッセイ系

技術分野

本願発明は、医療用医薬品の分野に係る蛋白質に関する。詳細には、血液凝固に関与するフォンビルブランド因子(von Willebrand Factor: 以下、vWFと称することがある)の特異的切断酵素(以下、ADAMTS-13と称することがある)の全長もしくは部分断片及びそれらに対する抗体に関する。本願発明で提供されるADAMTS-13に対する抗体により、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: 以下、TTPと称することがある)等を含む当該酵素の欠損・低下(一つの可能性として以下の報告がある; 例えば、非特許文献1参照)の診断または本酵素蛋白質に対する自己抗体陽性患者の診断及びそれにとりもなう疾病患者への当該酵素の補充療法のための効率的で高純度な当該酵素の調製の可能性が拓かれる。あるいはDisseminated intravascular coagulation(以下DICと略すことがある。)、などによる血小板減少と先天性・後天性TTPによる血小板減少の区別が可能となり、血小板輸注の際の指標を得ることが可能となる。さらには、新規な抗ADAMTS-13薬としての利用も考えられる。

背景技術

vWFは、血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生され、2050アミノ酸残基(モノマー約250kDa)からなる単一サブユニットがS-S結合にて結ばれたマルチマー構造(分子量500~20,000kDa)を持って存在している止血因子である。血中濃度は約10 μ g/mlで、一般に高分子量のものほど比活性が高い。

vWFには2つの大きな止血因子としての機能があり、1つは血液凝固第VIII因子と結合し、これを安定化させるキャリアー蛋白質としての働き、もう1つは

傷害血管壁の血管内皮細胞下組織に血小板を粘着・凝集させ、血小板血栓を形成する機能である。

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は、全身の体組織細動脈と毛細血管に血小板血栓を生じる疾患であり、今日の医療技術の進歩にもかかわらず、当該疾患での関連死亡率は1971～1991年にかけて約3倍に増加している。病理学的に、TTPは血管内皮細胞障害や血管内血小板凝集によって惹き起こされると考えられており、免疫組織学的には生じた血小板血栓中に多量のvWFの存在が認められ、vWFがこの成因に大きな役割を果たしていると考えられている。TTP患者のvWFのマルチマー構造は正常もしくは高分子量が優位となっており、特に通常では見られない超高分子量のvWF (unusually large vWF multimer: UL vWFM) や高分子量vWF重合体 (large vWF multimer: L vWFM) が、高ずり応力下での血小板凝集の促進と微小血栓形成に大きな役割を果たしていることが推察される。一方で、vWFは健常人の循環血液中で高ずり応力下、vWF切断酵素(vWF-cleaving protease)の作用により842 Tyr-843 Metの位置で分解を受けることが知られていた。したがって、TTPは血漿中の当該酵素活性が何らかの原因で低下して、UL vWFM～L vWFMが増加して血小板凝集が亢進し、血管内に血小板血栓が形成されるためというシナリオが描かれている。

2001年、この酵素活性を有する活性本体であるvWF切断酵素、別名ADAMTS-13をコードする遺伝子が本願出願人によりクローニングされた(WO 02/088366)。以下に、ADAMTS-13の分子構造に関する知見を整理する。

ADAMTS-13のドメイン構成はSignal peptideに続いてPropeptideが存在し、次いで、Furinの切断モチーフのRQRR配列が存在し、HEXXHXXGXXHDのコンセンサス配列からなるReprolysinタイプの亜鉛キレート領域を含むMetalloprotease domainが続く(P285stopまで)。そして、蛇毒メタロプロテアーゼで見出されるようなDisintegrin-like domainを経て(W387stopまで)、一般的に分子認識に重要と考えられているおよそ50～60残基からなる最初のTsp1 motif (Tsp1-1) (Q449stopまで)へとつながり、さらに、細胞接着モチーフの1つRGDS配列が含ま

れるCys-rich region (T581stopまで) へと続く。次いで、システイン残基を全く含まない約130アミノ酸残基からなるSpacer domain (W688stopまで) を経て、再びTsp1 motifの繰り返し (Tsp1-2~8) の後、補体成分C1rあるいはC1sの中に最初に見つかったとされるCUB domain-1, 2が続く。

ところで、本酵素の効率的、高純度な精製法あるいは本酵素の存在量に関して定性的、定量的な診断の方法は確立されていない。さらに本酵素に対する自己抗体陽性患者の診断法も確立されておらず、また、本酵素の活性発現の必須ドメインの特定もされていない。

発明の開示

斯かる状況に鑑み、本願発明の第一の課題は、高い選択性でADAMTS-13に対して免疫反応性を示す抗体を提供することにある。

本願発明の第二の課題は、斯かる抗体の製造方法を提供することにある。

本願発明の第三の課題は、斯かる抗体の用途を提供することにある。

本願発明の第四の課題は、上述の抗体あるいは自己抗体陽性患者由来の抗体の存在あるいは認識領域を特定することを可能にする全長もしくは部分欠失させたADAMTS-13分子を提供することにある。

本願発明の第五の課題は、斯かる全長もしくは改変分子の製造方法を提供することにある。

本願発明の第六の課題は、斯かる全長もしくは改変分子の用途を提供することにある。

vWF特異的切断酵素の先天性欠損患者及び後天性の当該酵素に対する抗体陽性患者の治療法として、現在までプラズマ交換療法が施されており、当該酵素の精製品または遺伝子組換え体等純品による補充療法の確立が望まれる。家族性TTP患者は、先天性にvWF特異的切断酵素が欠損しており、非家族性では後天的に当該酵素に対する自己抗体の産生が原因と報告されている。したがって、家族性TTP患者には、本酵素の補充療法が望ましく(現実には血漿投与が行われている)、非家族性では、血漿交換による自己抗体の除去と本酵素の補充が必要

である。

したがって、本酵素の効率的な調製法あるいは診断等が必要となるが、しかし、vWF切断酵素は、本願出願人による先の出願に記載の方法（WO 02/088366）、あるいはその他の方法（例えば、Kokame, K. ら、"Proc. N. A. S. USA"、2002年、第99巻、p. 11902-11907; Fujikawa, K. ら、"Blood"、2001年、第98巻、p. 1662-1666参照）により、血漿あるいは組換え体発現上清中より精製される方法では、十分な純度及び収量が期待できない。また、本酵素の存在量、特に抗原量としての酵素量を測定する術は今まで存在しなかった。またとくに血小板減少症においてDICなどが原因の場合と異なりTTPが基礎疾患として存在する場合の血小板輸注による症状の増悪などのリスクがあった。

従って、本発明はこれらの問題点を解決するためのvWF切断酵素に対する抗体の提供を目的とする。該抗体によりvWFの定量や精製が可能になる。

上述の状況の下、本願発明者等はvWF切断酵素の単離同定を達成するべく、鋭意研究を重ねた結果、従来報告のなかった所望のvWF切断酵素の精製単離に成功し、その成熟型蛋白質のアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコードする遺伝子を同定するに至った（WO 02/088366）。

そして、活性発現に必須と考えられる領域を特定するために、C末端側CUBドメインより逐次欠失した改変分子を作製し、そのvWF切断活性を測定した。これによりSpacer領域と呼ばれる配列番号1に掲げるアミノ酸番号で688位近傍よりN末端側から構成される分子においてもその定性的な酵素活性は維持されることが確認された。一方で581位近傍までから構成される分子では正常な分泌が阻害され、449位近傍までから構成される分子では培養上清中への分泌は認められるもののその酵素活性は微弱あるいは活性が認められないことが確認され、これらの知見により本酵素分子の活性発現に必須な領域が示された。これらから本酵素活性を中和しうる抗体の作製に必要なエピトープ領域あるいは活性を有する本酵素分子の検出が可能な抗体の作製が可能となった。

そして、得られるADAMTS-13のアミノ酸配列を基に調製されるペプチド等を抗原にして、通常の方法（Current Protocols in Molecular Biology, Edited

by F.M. Ausbel et al. (1987)、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. (1996)、Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by Harlow David Lane (1988) あるいはANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. BORREBAECK (1995)) によってモノクローナル及びポリクローナル抗体等の作製が可能である。あるいは、ファージディスプレイ技術を利用した抗体作製技術 (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Edited by Brian K. Kay et al. (1996)、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. (1996)、あるいはANTIBODY ENGINEERING second edition edited by Carl A. K. BORREBAECK (1995)) により当該蛋白質と結合する抗体の作出が可能である。あるいは、これらの技術に基づき、本酵素に対する自己抗体陽性であるTTP患者検体からの本酵素活性の中和抗体もしくは単なる結合抗体の単離も可能である。そして、これらの抗体を用いることで、本酵素量の変動を伴う疾病、例えばTTPなどの疾患の診断及び治療への応用が可能となる。あるいは調製された抗体を用いて例えばマウスのADAMTS-13に対する抗体を作製し、マウスへ移入もしくは、この抗体の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをマウスへ移入することにより、自己抗体陽性のモデルマウスが作出される。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] フォンビルブランド因子特異的切断酵素 (以下、ADAMTS-13と称することがある) を構成するアミノ酸配列のうち全長または1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質またはペプチドに対する抗体、

[2] ADAMTS-13が霊長類または齧歯類を起源とするものである[1]の抗体、

[3] 配列番号1記載のADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質に対する抗体、

[4] 配列番号 1 記載の ADAMTS-13 を構成するアミノ酸配列よりなるポリペプチドに対し、当該ポリペプチドの Spacer 領域より N 末端側または Metalloprotease 領域、Disintegrin-like 領域、Tsp1-1 領域、Cys-rich 領域から Spacer 領域の間を認識する抗体、

[5] [1] から [4] のいずれかの抗体であって、ADAMTS-13 を構成するアミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質のアフィニティー精製に用いられ得る抗体、

[6] [1] から [4] のいずれかの抗体であって、ADAMTS-13 を構成するアミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質が有する酵素活性を阻害もしくは中和し得る抗体、

[7] ADAMTS-13 の Spacer 領域より N 末端側、Metalloprotease 領域または Disintegrin-like 領域を認識する [6] の抗体、

[8] 配列番号 2 及び 3 の ADAMTS-13 部分ペプチドを含有してなる免疫原により調製された抗体、

[9] 配列番号 1 記載のポリペプチド鎖の全長あるいはその一部の発現物を免疫あるいはそれを発現する発現ベクターを直接動物にトランスフェクトし得られる抗体、

[10] ポリクローナル抗体である、[1] から [9] のいずれかの抗体、

[11] モノクローナル抗体である、[1] から [9] のいずれかの抗体並びにその抗体をコードする遺伝子、

[12] ハイブリドーマ WH10、WH63.1、WHS40.3、Pep4-34.1、WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6A および Pep4-5B-1 からなる群から選択されるハイブリドーマが産生する抗体である [9] のモノクローナル抗体並びにその抗体をコードする遺伝子、ここで WH10、WH63.1、WHS40.3 および Pep4-34.1 は、独立行政法人 産

業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、それぞれ受託番号 FERM BP-8174、FERM BP-8175、FERM BP-8176及びFERM BP-8177として、2002年9月4日に、寄託されている。WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6AおよびPep4-5B-1は、それぞれ受託番号 FERM BP-8483、FERM BP-8484、FERM BP-8485、FERM BP-8474及びFERM BP-8475として、2003年4月22日および2003年9月10日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている、

[13] [1]から[12]のいずれかの抗体によって認識されるADAMTS-13のエピトープに結合または競合的に結合することができる抗体、

[14] [1]から[13]のいずれかの抗体を含む医薬品組成物または診断薬、

[15] [1]から[13]のいずれかの抗体を構成成分とする標識蛋白質、

[16] [1]から[13]のいずれかの抗体を産生し得る単離された細胞、

[17] ハイブリドーマである[16]の細胞、

[18] ハイブリドーマ株WH10（受託番号FERM BP-8174）、ハイブリドーマ株WH63.1（受託番号FERM BP-8175）、ハイブリドーマ株WHS 40.3（受託番号FERM BP-8176）、ハイブリドーマ株Pep4-34.1（受託番号FERM BP-8177）、ハイブリドーマ株WH2-22-1A（受託番号FERM BP-8483）、ハイブリドーマ株WH2-1-1（受託番号FERM BP-8484）、ハイブリドーマ株WH2-11-1（受託番号FERM BP-8485）、ハイブリドーマ株Pep6-6A（受託番号FERM BP-8474）およびハイブリドーマ株Pep4-5B-1（受託番号FERM BP-8475）からなる群から選択される[17]の細胞、

[19] [1]から[13]のいずれかの抗体を含んでなる免疫測定キット、

[20] ADAMTS-13のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程と、該免疫感作された温血動物の体液から[1]から[1

3]のいずれかの抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法、

[2 1] 温血動物を免疫感作するためのポリペプチドが、ADAMTS-13の一部として、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部または全部を含む[2 0]の抗体の製造方法、

[2 2] [1]から[1 3]のいずれかの抗体を産生し得る単離された細胞を生体内または生体外で培養する工程と、その体液または培養物から該抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法、

[2 3] 抗体を産生し得る単離された細胞がハイブリドーマである[2 2]の抗体の製造方法、

[2 4] 塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる1種または2種以上を含む精製方法により抗体を採取する[2 0]から[2 3]のいずれかの抗体の製造方法、

[2 5] [1]から[1 3]のいずれかの抗体を被験試料に接触させ、免疫反応によりADAMTS-13を検出することを特徴とするADAMTS-13の検出方法、

[2 6] [1]から[1 3]のいずれかの抗体を利用するラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイである[2 5]の検出方法、

[2 7] 被験試料が生体から採取した生物学的試料である[2 5]または[2 6]にの検出方法、

[2 8] [1]から[1 3]のいずれかの抗体をADAMTS-13と夾雑物質とを含む混合物に接触させて抗体に当該蛋白質を吸着させる工程と、吸着した当該蛋白質を抗体から脱着させる工程を含むADAMTS-13の精製方法、

[2 9] 抗体が水不溶性担体に結合している[2 8]の精製方法、

[3 0] ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とする診断薬あるいは医薬品、

[3 1] ADAMTS-13のSpacerからN末端側、あるいはmetalloprotease領域、Disintegrin-like領域、Tsp1-1領域、Cys-rich領域からSpacer領域を主成分とす

る[30]の診断薬あるいは医薬品、

[32] ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とした当該ポリペプチド鎖に対する抗体検出用の試薬・診断薬または医薬品、ならびに

[33] ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とした抗体検出またはエピトープ解析用抗原の利用及びその調製法である。

ADAMTS-13に結合できる抗体を、ここに開示する。これらの抗体は、当該分野において標準的な技術を用いて改変することができる。また、ここに最初に例示する抗体と類似する抗体を、ここに教示する方法と公知の方法とを組み合わせる製造することもできる。抗体を生成するこれらの方法は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル）を、ADAMTS-13またはそれらのフラグメントで免疫あるいはADAMTS-13を遺伝子組換え的に発現できる発現ベクターを皮下、皮内もしくは筋肉内にトランスフェクトすることを含む。抗体は、当該分野において公知の様々な技術を用いて、免疫した動物から得ることができ、好ましくは、興味のある抗原に対する抗体の結合を用いて、スクリーニングすることができる。抗体及び／または抗体生成細胞の動物からの単離は、動物を屠殺する工程によって行なうことができる。

ADAMTS-13で哺乳動物を免疫する代替または補足として、ADAMTS-13に対する特異抗体を、例えば、ラムダバクテリオファージもしくは表面に機能的なイムノグロブリン結合ドメインを示すバクテリオファージフィラメントを用いて、発現させたイムノグロブリンの可変ドメインの組換え生成ライブラリーから得ることができる。ライブラリーは、いかなるADAMTS-13（もしくはフラグメント）によっても免疫されていない生物から得られた配列から構築された天然のもの、または興味のある抗原に曝された生物から得られた配列を用いて構築されたものとすることができる。

ここに用いられるモノクローナル抗体は、KohlerとMilstein, Nature, 256:495, 1975によって最初に記載された方法、または組換え方法（MageとLamoyi、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 79-97頁、Marcel Dekker社、New York, 1987を参照）によって作製

することができる。

ハイブリドーマ法において、免疫のために用いられるADAMTS-13と特異的に結合する抗体を生成する、もしくは生成することができるリンパ球を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋内経路で、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル等の適した宿主温血動物を抗原で免疫する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫することができる。次いで、リンパ球を、適した融合剤、例えばポリエチレングリコールなどを用いてミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる [Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986) 参照]。

免疫に用いる抗原としては、ヒトまたは非ヒト哺乳類の血液から単離した天然のvWF切断酵素、遺伝子工学の手法を用いて作製したリコンビナントのvWF切断酵素が挙げられ、由来はヒトでも他の哺乳類でもよい。全長vWF切断酵素を用いることもでき、酵素的に切断したフラグメントあるいはvWF切断酵素をコードするDNAのフラグメントを用いて遺伝子工学的に作製した、リコンビナントのvWF切断酵素の部分ペプチドを用いることができる。vWFの断片としては、例えばSpacer領域よりN末端側またはMetalloprotease領域、Disintegrin-like領域、Tspl-1領域、Cys-rich領域からSpacer領域の間を含む断片が挙げられる。

このように調製したハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の親ミエローマ細胞の増殖もしくは生存を阻害する一以上の物質を含む、適した培地中に播種し、培養することができる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRTもしくはHPR T) を欠く場合、ハイブリドーマ用培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み (HAT培地)、これらの物質がHGPRT欠損細胞の増殖を阻害する。

好ましいミエローマ細胞は、有効に融合し、選択された抗体生成細胞によって安定した高レベルでの抗体発現が支持され、HAT培地などの培地に感受性を有するものである。

ハイブリドーマ細胞を培養する培地は、ADAMTS-13に対するモノクローナル抗体の生成でアッセイする。好ましくは、特異結合は、固相酵素免疫検定アッセイ (ELISA) によって測定される。本発明のモノクローナル抗体は、ADAMTS-13あるいはその部分断片に特異的に結合するものである。

抗体が結合するエピトープは、後述するC末欠失改変ADAMTS-13分子を発現させることでマッピングすることができる。従って、本発明は、例示された抗体が結合するADAMTS-13エピトープと結合することができる抗体を含む。

本発明の好ましい実施態様において、モノクローナル抗体は、マイクロモルを超える親和性、または、例えばスキャッチャード分析により測定された時 (MunsonとPollard、Anal. Biochem. 107:220, 1980参照) に、より大きな親和性 (すなわち 10^{-6} モルよりも大きな親和性) を有するであろう。

所望する特異性と親和性の抗体を生成するハイブリドーマ細胞を同定した後に、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で培養する。この目的のために適した培地は、Dulbecco's 改変イーグル培地またはRPMI-1640培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物における腹水腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

該ハイブリドーマ細胞をin vitro で培養することにより、所望の抗体を含む培養上清が得ることができる。また、該ハイブリドーマをマウス等の哺乳類の腹腔に移植することにより、所望の抗体を含む腹水を得ることができる。

ハイブリドーマにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来のイムノグロブリン精製法、例えばプロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどによって、好適に、培地、腹水液、または血清から分離される。

本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該分野において公知の方法、例えば齧歯類抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて、容易に単離、配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、抗体またはそれらのフラグメントをコードする核酸の好ましい供給源である。単離後、核酸は、発現ベクターまたはクローニングベクタ

一に結紮し、次いでこれを宿主細胞に形質転換し、組換え宿主培養細胞においてモノクローナル抗体が生成されるように、これを培養することができる。

所望する結合特性を有する抗体を生成することができるハイブリドーマは、抗体（抗体フラグメントを含む）をコードする核酸を含み、それらを発現することができる宿主細胞として、本発明の範囲内である。また、本発明は、抗体が生成し、好ましくは分泌される条件下で、抗体を生成することができる細胞を培養することを含む、抗体の生成方法を提供する。

本発明の抗体は、様々な方法で改変することができる。さらに言えば、「抗体」という用語は、必要とされる特異性を示す結合ドメインを有する全ての結合物質を網羅するものとして解釈されるべきである。従って、本発明は、抗原またはエピトープ、ここではADAMTS-13に結合することができる抗体に類似した形状を有する、合成分子と分子を含む、抗体フラグメント、誘導體、抗体の機能的均等物及び相同体を網羅するものである。

抗原または他の結合対を結合することができる抗体フラグメントの実施例は、VL、VH、C1及びCH1ドメインからなるFabフラグメント；VHとCH1ドメインからなるFdフラグメント；抗体の単一アームのVLとVHドメインからなるFvフラグメント；VHドメインからなるdAbフラグメント；単離されたCDR領域とF(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジによって連結された二つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである。また、単一鎖Fvフラグメントも含まれる。

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、遺伝変異またはその他の変異を受けることができる。さらに、当業者によって、モノクローナル抗体は、元の抗体の特異性を保持するその他の抗体、ヒト化抗体またはキメラ分子を作製するための組換えDNAテクノロジーの技術を受けることができると解されるであろう。そのような技術は、抗体の、イムノグロブリンの可変領域または相補性決定領域（CDR）をコードするDNAを、異なるイムノグロブリンの、定常領域または枠組み領域をつなげた定常領域に導入することを含むことができる。

本発明で提供されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、WH10、WH63.1、WHS40.3、Pep4-34.1、WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6A およびPep4-5B-1が挙げられる。

イムノアッセイ

本発明の抗体は、様々なアッセイ形式で、本発明の検出または診断方法において用いることができる。抗体は、ADAMTS-13に特異的に結合できる結合剤として用いることができ、例えば、*in vitro* において試料中のADAMTS-13の検出を可能にする。または試験試料と接触させた後に、試験試料中の被検体（分析対象物）であるvWF切断酵素によって占められた結合剤の結合部位の画分を測定するための現像剤として用いることができる。すなわち、本発明の抗体がその結合部位で、分析対象物と結合し、分析対象物に結合した抗体の量を測定することにより、分析対象物の量もわかり、本発明の抗体をあたかも被検体の存在を明らかにする現像剤のように利用することができる。

抗体の使用、特にアッセイにおける現像剤としての抗体の使用は、検出できて、好ましくは測定できるシグナルを、直接的または間接的に産出することができる、標識物質またはレポーター分子で、それらを標識することを含む。また、本発明の抗体には標識した抗体も含まれる。標識は標識物質またはレポーター分子と抗体を連結させることにより行い、この連結は、直接的または間接的に、例えばペプチド結合を介した共有結合または非共有結合とすることができる。ペプチド結合を介した連結は、抗体とレポーター分子をコードする遺伝子融合体の組換え発現により得ることができる。Hunterら、*Nature*, 144:945, 1962 ; Davidら、*Biochemistry* 13:1014, 1974 ; Painら、*J. Immunol. Meth.* 40:219, 1981 ; 及び Nygren、*J. Histochem. and Cytochem.* 30:407, 1982に記載された方法を含む、抗体を検出可能部分に別々に結合させるための当該分野において公知のあらゆる方法を、用いることができる。

標識物質またはレポーター分子としては、スペクトル的に単離された吸光もしくは発光特性を有する、各蛍光色素、蛍光体もしくはレーザー染料等が挙げられ、

これらと抗体を共有結合により連結すればよい。適した蛍光色素は、フルオロレセイン、ローダミン、ルシフェリン、フィコエリスリン及びテキサスレッドを含む。適した発色性染料は、ジアミノベンジジンを含む。他の検出できる標識は、放射性同位元素標識、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と、検出できる反応生成物をもたらす反応を触媒し、シグナルを増幅することができる酵素標識、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。またこれら酵素の標識にはビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジン結合を用いるなど、当該分野に公知の技術を用いて行なうことができる。

他のレポーター分子は、視覚的に観察される、電氣的に検出される、またはその他の手段により記録される、検出可能なシグナルを、直接的または間接的にもたらすことができる、着色された、高分子コロイド粒子または例えばラテックスビーズなどの微粒子物質を含む。また、磁性または常磁性の微粒子も用いることができる。さらに、レポーター分子は、例えば、着色反応、変色反応、または電氣的特性を変化させる反応を、触媒する酵素であってもよい。これらは、エネルギー状態間の電氣的遷移により、特徴的なスペクトル吸収もしくは発光を生じるような、分子反応性を有していてもよい。さらに、これらは、バイオセンサーと結合して用いられた化学的な存在を含むことができる。

さらに、抗体は、試料中に存在する他の物質に優先して、ADAMTS-13と特異的に結合できることから、抗体を結合剤として用いることができる。好適には、結合剤は、アッセイ中にそれらを容易に操作できるように、固体支持体上に、例えば特定の部位で、固定化する。固定化は、物理吸着または化学吸着などの当該分野に公知の技術を用いて行なうことができ、例えば、固型支持物（固体支持体）に抗体を化学的に結合させるためのビオチン/アビジンまたはビオチン/ストレプトアビジンを用いることができる。通常、試料中に存在するADAMTS-13が結合剤に結合できるように、適切な条件下で、結合試薬と試料を接触させる。次いで、結合剤の結合部位の画分占有率を、現像剤を用いて測定することができる。すなわち、試料中の分析対象物と結合した抗体の量を測定することにより、分析対象

物の量を測定することができる。

本発明の抗体を上記の現像剤として用いる場合、現像剤は、当該分野における公知の技術を用いて検出することができるように、（例えば、放射能標識、蛍光標識または酵素標識で）標識する。従って、放射能標識は、シンチレーションカウンタまたは他の放射線計数装置を用いて検出することができ、蛍光標識は、レーザーもしくは共焦点顕微鏡を用いて検出することができ、酵素標識は、基質における酵素標識の作用、典型的には、色の変化を生じる作用によって検出することができる。結合剤の占有結合部位に対して、現像剤が被検体と競合する競合的方法において、または結合剤と結合した、もしくは占有結合部位に結合した被検体と標識化現像剤が結合する非競合的方法において、現像剤を用いることができる。両方の方法により、被検体によって占有された結合部位の画分が示され、これにより試料中の被検体濃度が、例えば被検体の既知濃度を含む試料を用いて得られた標準と比較して、示される。

診断的アッセイは、患者からの生物学的試料を用いて行なわれる。これらの試料は、前処置なしに直接的に用いられることもできるし、アッセイを行なう前に例えば遠心分離やろ過により干渉する可能性のある試料中の物質を除去する等の処置を行ってもよい。適した生物学的試料の例は、血液、尿、汗、組織もしくはその抽出液または血清である。

一実施態様において、本発明は、TTP、TTP様の疾患またはvWF依存性の血栓症（vWFによりもたらされる血栓症）の恐れのある患者がこれらの疾患に罹患しているか否かを診断する方法、あるいは罹患するリスクがあるかを評価する方法に関し、該方法は、以下の工程を含む：（a）患者から得られた生物学的試料を、ADAMTS-13と特異的に結合できる抗体を固定化した固型支持物と接触させること；

（b）抗体を固定化し、さらに試料を接触させた固型支持物を、抗体の未占有結合部位、抗体に結合した結合ADAMTS-13または抗体の占有結合部位に結合できる標識化現像剤と接触させること；及び、（c）試料中におけるADAMTS-13の濃度に相応する値を得るために、工程（b）において特異的に結合した現像剤の標識

を検出すること。

さらなる実施態様において、本発明は、患者における vWF 依存性の血栓にまつわる診断をするための方法を提供し、該方法は以下を含む：（a）患者の生物学的試料を、請求項記載のいずれか一つの抗ADAMTS-13抗体と接触させること；及び、（b）試料中におけるADAMTS-13の抗ADAMTS-13抗体に対する結合を測定すること。

そしてさらに、試料中のADAMTS-13濃度に相応する値を、既知標準から得られた値に相関させる工程、例えば濃度が既知の標準物質を測定し、標準曲線を作成し、濃度未知の物質測定に得られた測定値を標準曲線と比較し濃度を算出する工程を、さらに含む。

本発明の抗体は、あらゆる公知の免疫学的測定方法、例えば競合的結合アッセイ、直接的及び間接的サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイ [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp147-158 (CRC Press社、1987) 参照]、において用いられることができる。

サンドウィッチアッセイは、各々、検出されるADAMTS-13の異なる免疫性部位またはエピトープに、結合できる二種の抗体を使用する。サンドウィッチアッセイにおいて、試験試料の被検体を、固型支持物上に固定化されている一次抗体と結合させた後、該被検体に二次抗体を結合させて、不溶性の三部複合体（抗原、一次抗体および二次抗体）を形成させる。二次抗体は、検出できる部分（標識物質またはレポーター分子）で標識することができ、または検出できる部分で標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて測定することができる（間接的サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一つの型は、検出できる部分が酵素であるELISAアッセイである。

本発明の抗体を含む免疫測定キットも本発明に包含される。該キットが酵素免疫測定法に基づく場合は、抗体を固相化した担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。該キットがラテックス等の担体を用いた凝集法に基づく場合は、抗体が吸着した担体を含んでいてもよい。また、該キットは適宜、標準試料、ブロックング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理する

ための試薬等を含んでもよい。

また、本発明の抗体は、インピボでのイメージングに有用であり、ここで、抗体は、放射性同位元素などの検出できる部分で標識され、宿主に、好ましくは血流中に投与され、宿主における標識化抗体の存在と局在が測定される。抗体は、 vWF 切断酵素が存在または局在する組織、器官等に結合し得る。抗体は、核磁気共鳴、X線透視、または当該分野において公知のその他の検出手段によって、検出できるあらゆる部分で、標識することができ、検出できる部分に応じて特定の検出手段を用いることにより、標識抗体の存在または局在を測定することができ、すなわち vWF の存在または局在を検出することができる。

また、本発明の抗体は、アフィニティークロマトグラフィーにおけるアフィニティー精製用試薬としても有用である。この方法において、抗体は、セルロファイン樹脂等の合成樹脂、濾紙等の支持物上に、当該分野に公知の方法を用いて固定化する。次いで、精製すべきADAMTS-13を含む試料と固定化した抗体を接触させた後、固定化抗体に結合するADAMTS-13以外の試料中の全物質を完全に除去し得る溶剤で、支持物を洗浄する。最後に、支持物を、抗体からADAMTS-13を遊離させ得る溶剤、例えばグリシン緩衝液、 $pH\ 3\sim 5$ で洗浄することにより、 vWF 切断酵素を単離・精製することができる。

本発明の抗体またはADAMTS-13分子もしくはその変異体は、薬学的組成物中に配合することができる。すなわち、本発明は本発明の抗体またはADAMTS-13分子またはその変異体を含む薬学的組成物を包含する。ここで、変異体とは、分子全体のうち薬学的効果を奏する部分を含むフラグメントまたはADAMTS-13分子のアミノ酸配列において1個から数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有する分子である（必ずしも活性を保持した改変に絞らない）。

本発明の抗体は、ADAMTS-13が有する酵素活性を阻害し、または中和し得る抗体を含む。該抗体は、好ましくはADAMTS-13のドメイン構造中のSpacer領域よりN末側に存在するエピトープを認識し結合する。また、該抗体は、metalloprotease領域、Disintegrin-like領域、Tspl-1領域またはCys-Spacer領域に存在するエピトープを認識し結合する。

薬学的組成物は、上記の抗体またはADAMTS-13分子もしくはその変異体に加えて、薬学的に受容できる賦形剤、担体、緩衝液、安定剤または当該分野において公知であるその他の物質を含むことができる。そのような物質は、無毒であり、活性成分の効能に干渉しないものである。担体またはその他の物質の厳密な性質は、投与経路、例えば口、静脈、皮膚もしくは皮下、鼻、筋内、腹腔内経路に依存し、投与経路に応じて適切なものを選択することができる。

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体形状であることができる。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固型担体を含むことができる。液体の薬学的組成物は、通常、液体の担体、例えば水、石油、動物性油、植物性油、鉱物性油、または合成油であることができる。生理食塩水、ブドウ糖もしくは他のサッカリド溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコールが含まれる。

静脈、皮膚もしくは皮下注射または苦痛部位への注射の場合は、活性成分が、発熱性因子を含まず、好適なpH、等張性及び安定性を有する、腸管外で受容できる水溶液の形状とするであろう。当業者は、適切な溶液を、例えば等張性の媒体、例えば塩化ナトリウム液、リンゲル液、乳酸加リンゲル液などを用いて、調製することができる。防腐剤、安定剤、緩衝液、抗酸化剤、及び／またはその他の添加剤を必要に応じて含むことができる。

本発明のADAMTS-13に対する抗体またはADAMTS-13分子もしくはその変異体を生理食塩水、緩衝液等で希釈して製剤化し、医薬組成物を得ることもできる。製剤のpHは体液のpHに近い弱酸性～中性域のpHが望ましく、その下限は5.0～6.4が望ましく、その上限はpH6.4～8.0が望ましい。また、凍結乾燥形態等の長期間保存可能な形態で提供することもでき、この場合使用時に水、生理食塩水、緩衝液等で所望の濃度になるように溶解して使用することができる。本発明の製剤は、通常医薬品に用いられる薬理的に許容される添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤または製薬上必要な成分を含有していてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビ

トール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示され、1～10w/v %程度が添加されていることが好ましい。

本発明の医薬組成物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等により有効量で投与することができ、1回または数回に分けて投与される。その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、1回あたり、0.001mg～100mgが好ましい。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2002-279924号および2002-377569号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、抗体のエピトープを決定するためのC末欠失変異体作製法を示す図である。

図2は、調製されたC末欠失変異体の一時発現を抗FLAG抗体を用いて非還元下ウェスタンブロットにて確認した図である。

図3は、調製されたC末欠失変異体の一時発現のvWF切断活性を還元下のSDS-PAGEにて確認した図である。

図4は、PoAb1のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

図5は、PoAb2のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

図6は、MoAb Pep4-34-1のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

図7は、MoAb WH10のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンブロットの図である。

図8は、MoAb WH63-1のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタン

プロットの図である。

図 9 は、MoAb WHS40-3 のエピトープを確認した結果を示す非還元下ウェスタンプロットの図である。

図 10 は、各種抗体の認識領域と活性発現に重要な領域をまとめた図である。

図 11 は、vWF 切断酵素の部分合成ペプチドを免疫して得られたウサギ抗血清を用いた健常人血漿及びTTP患者血漿中のADAMTS-13の確認を還元下ウェスタンプロット法で行なった結果を示す図である。

図 12 は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせる構築したELISA系の模式図とアッセイの流れ図である。

図 13 は、ドメイン毎に調製された抗体により構築されたELISA法の概念図である。

図 14 は、モノクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせる構築したELISA系の模式図とアッセイの流れ図である。

図 15 は、ヒト胎児腎細胞株293を宿主とした培養上清から抗体カラムによりアフィニティー精製された遺伝子組換えADAMTS-13のSDS-PAGEの泳動図である。

図 16 は、ヒトプール血漿のFIペーストから抗体カラムによりアフィニティー精製されたADAMTS-13のSDS-PAGEの泳動図である。

図 17 は、抗体を用いた中和活性能の評価（非還元下のvWF切断活性のSDS-PAGE）を示す図である。

図 18 は、後天性TTP患者血漿中の抗ADAMTS-13抗体の検出（ELISA法）を示す図である。

図 19 は、マウス血漿中のADAMTS-13の検出（ウェスタンプロット法）を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

実施例 1

(ポリクローナル抗体 (PoAb) の作製)

マウスまたはウサギに、常法により (Current Protocols in Molecular Biology : Chapter 11 immunology、Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J. McCafferty et al. あるいは ANTIBODY ENGINEERING second edition Edited by Carl A. K. BORREBAECK など)、ヒトプラズマより部分精製した抗原タンパク、あるいはその一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド (例として、配列番号 2 または配列番号 3 記載のペプチド) を適切なキャリアー物質 (KLH 等) に結合させたもの (KLH を付加しやすくするために Cys を N 末端あるいは C 末端などに付加したもの)、あるいは遺伝子組換えタンパク質またはそれをコードする遺伝子を導入した発現ベクターを皮下・皮内または筋肉内にトランスフェクトし、モノクローナル抗体発現ハイブリドーマの確立及びポリクローナル抗体 (PoAb) の作出を行なった。PoAb に関しては全長または後述する Q449stop または P285stop を発現するベクターのトランスフェクトにより PoAb1、PoAb2 及び PoAb3 の三種を作製した。

実施例 2

(モノクローナル抗体 (MoAb) の作製)

Balb/c マウスに、初免疫感作として後肢にフロイント完全アジュバント存在下で遺伝子組換え由来 ADAMTS-13 または配列番号 2 もしくは配列番号 3 記載のペプチドを、KLH をキャリアーとして付加したものを調製した。ADAMTS-13 は WO 02/088366 に記載の方法で調製すればよい。

調製した抗原の 1 μ g から 10 μ g 相当量を 1 回接種した後、1 週間後に常法に従いマウス後肢大腿部のリンパ節または脾臓より細胞を採取した。それぞれマウス 2 匹から、得られた細胞をミエローマ細胞 P3X63Ag8U.1 (P3U1) (ATCC 寄託番号 CRL-1597: Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 81, p. 1 (1978)) と細胞数 1 対 1 ~ 2 の割合で混合し、遠心処理 (1,500 rpm、5 分) して上清を除き、沈殿した細胞塊を充分ほぐした後、予め 37℃ に加温しておいた 1 ml のポリエチレングリコール溶液 (45% ポリエチレングリコール 4000、55% RPMI 培地) を

攪拌しながら加えた。37℃で5分間インキュベートした後、液の全量が50 mlとなるようにゆっくりとRPMI培地を加えた。遠心分離(1,300 rpm、7分)後、上清を除去して緩やかに細胞をほぐした。これにエスロンCM-B培地(三光純薬社製)50 mlを加え、メスピペットを用いて緩やかに細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を4~5枚の96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに100 μ lずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。翌日に、HAT培地(エスロンCM-B培地にヒポキサンチン 1×10^{-4} M、チミジン 1.5×10^{-8} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mになるよう添加したもの)を各ウェルに100 μ lずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。ハイブリドーマのコロニーが十分生育したものからHT培地(上記HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)に交換し、培養上清の一部を分取し、以下に述べるスクリーニング法にて目的のハイブリドーマを選別した。

目的のハイブリドーマの選別は下記のELISA法、ウエスタン・ブロッティング法を組み合わせ実施した。

(1) ELISA法

96ウェルのマイクロテストプレートに前記のごとく作製した合成ペプチド抗原、または精製抗原(蛋白質濃度0.5~2 μ g/ml)を50 μ l/ウェルで加え、4℃で一晩インキュベートすることにより固相化した。さらに、1%BSA(ウシ血清アルブミン)溶液300 μ lを加え、同様にインキュベートしてマスキングを行なった。このようにして作製した抗原固相化プレートに細胞融合法によって得られたハイブリドーマ及びクローニング後のハイブリドーマの培養上清を加えて、4℃で1時間インキュベート後、TBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体溶液(カッペル社製、5,000倍希釈)を100 μ l/ウェル加えた。4℃で1時間インキュベート後、TBSにて3回洗浄し、その後TMBZ基質溶液を加え、常法により発色させその吸光度を波長450 nmにて測定した。こうして精製抗原と反応するハイブリドーマクローンを選択した。また、この方法はさらにヒト血漿中のADAMTS-13に対する自己抗体検出への

応用も可能であった。

(2) ウェスタン・ブロッティング法

ELISAで得られた陽性コロニーについてウェスタン・ブロッティング法によるスクリーニングを行なった。精製抗原を8%のSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、PVDF膜上に移行させ、膜を0.4~0.5cm幅に切断した。各細片をハイブリドーマ培養上清液に浸し、1時間37℃でインキュベートした。その後、細片をTBST(0.05%Tween含)で3回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(TAGO社製)の1:2000希釈液中で37℃、1時間インキュベートした。TBSTで3回洗浄後、BCIP/NBTを用いる発色試薬(Bio-Rad社製)で発色させ、精製抗原の発色バンドを示すハイブリドーマを選択しクローニングした。クローニング後のハイブリドーマクローンについても同様の手法で選別した。上記の選別方法によって所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがおおよそ30クローン得られた。また、この方法はさらにヒト血漿中のADAMTS-13に対する自己抗体検出への応用も可能であった。

実施例 3

(ADAMTS-13 C末端欠失変異体の作製)

図1に示すストラテジーにより、全長のvWF切断酵素遺伝子クローニングベクター(pCR2.1vWFCP)を利用して、全長及び配列番号表4から18に示すプライマーを用いてC末端より逐次ドメインを欠失させた変異体(Full1427stop、T1135stop、W1016stop、W897stop、W808stop、W746stop、W688stop、T581stop、Q449stop、W387stop、P285stop、:それぞれの数字は開始コドンATGのコードするMetから終結コドンまでのアミノ酸の残基数を示し、FLAGエピトープ(DNA配列:gactacaaggacgatgacgataagtga(配列番号表19)、アミノ酸配列:Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys(配列番号表20))を付加した部位を示す。)を発現する遺伝子を調製し、pCAG発現ベクター(Niwa, H., et al. Gene vol.108, 193-199)に組み込み、Hela細胞を用いて、以下の手順でトランスフェクトした。

全長のvWF切断酵素遺伝子クローニングベクター(pCR2.1vWFCP)は、W0

02/088366に記載の方法により入手可能である。

まず初めに、 $1-3 \times 10^5$ 個/35mm dishで細胞を撻き、その翌日に上記発現ベクターを2 μ g当たり10 μ lのPolyamine Transfection ReagentであるTransIT (TAKARA社製) をとり、Opti-MEM等の無血清培地200 μ lに添加して、試薬添付文書に従い、DNAとのコンプレックスを調製後、準備しておいた前記各種細胞へ滴下し、6時間インキュベーションし、その後、培地をASF104無血清培地 (味の素社製) に変更後、72時間37℃インキュベーション後、その上清を回収した。検出は抗FLAG-M2抗体 (コダック社製) を用いたウエスタンブロット法により、抗マウスIg-アルカリフォスファターゼ酵素標識抗体系で染色して行なった (図2に発現の様子を確認した結果を示す。)。また本改変分子群はFLAGタグを付加しており、常法である抗FLAGタグ抗体固定化アガロース等を用いて容易に精製可能であった。

実施例 4

(ADAMTS-13 C末欠失変異体のvWF切断活性確認)

vWFの調製

vWFは、セファクリルS-500HR (アマシャムファルマシア) の2.6×90 cmカラムにより、プラズマクリオ画分2gを20 mLのバッファー (0.01% Tween-80 / 50 mM Tris-HCl / 100mM NaCl pH 7.4) に溶解したものをゲル濾過することにより調製した (WO 02/088366を参照)。

vWF切断反応

vWF切断活性のアッセイは、WO 02/088366に記載の方法で行った。すなわち、終濃度10mMの塩化バリウムを加えたサンプルを37℃で5分間プレインキュベートし、プロテアーゼの活性化を行なった。50mLのファルコンチューブにバッファー (15~20mLの1.5M Urea / 5mM Tris-HCl pH 8.0) を入れた。次にミリポア社製のメンブレンフィルター (0.025 μ m) を浮遊させ、50 μ LのvWF基質溶液を加えて混合した活性化サンプルを100 μ L添加した。37℃のインキュベーターに一晩静置して翌日フィルターから回収した。回収したサンプルを、以下のSDS-PAGEの項に示すvWFの切断パターンにより評価した。

SDS-PAGE

SDS-5%ポリアクリルアミドゲルを自家調製し使用した。v W F 切断活性のアッセイ項で述べたサンプル10 μ Lに、SDS泳動バッファー (還元剤2-メルカプトエタノール存在下または不在下) 2 μ Lを加え3分間煮沸したものを泳動サンプルとした。30mAで1時間電気泳動したのち、ゲルはCBB染色を利用したGel Code Blue Stain Reagent (PIERCE社) にて染色した。

その結果、図3に示す如く、Full-lengthの分子からW688stopまでの分子で明らかなv W F 切断活性が認められた。また先の抗FLAG抗体による上清中への発現パターンを考慮した場合、T581stopでの発現が上清中に認められないことからこの近傍 (Cys-rich領域からSpacer領域) での切断は分泌障害を起こす場合があることが確認され、本酵素活性を維持するためには、この領域を含むことが重要であることがわかった。

実施例 5

(ウェスタンブロットを利用した抗体のエピトープの解析)

常法により、ウェスタンブロットを行ない、確立したポリクローナル抗体 (PoAb1, PoAb2) 及びお互いに認識部位が競合しないと考えられたモノクローナル抗体数種 (本発明者らが先に作製したClone No. WH10 (FERM BP-8174) に加えて、WH63.1 (FERM BP-8175)、WHS40.3 (FERM BP-8176)、Pep4-34.1 (FERM BP-8177)) についての認識領域を特定するため、実施例4記載の部分欠失改変分子の一時発現培養上清を利用し、ウェスタンブロットを行なった (図4~9)。

これに加えて新たに確立されたクローンWH2-22-1A (FERM BP-8483)、WH2-1-1 (FERM BP-8484)、WH2-11-1 (FERM BP-8485)、Pep6-6A (FERM BP-8474)、Pep4-5B-1 (FERM BP-8475) についても同様の解析を行った。決定された抗体の認識領域及び活性発現に重要と考えられた領域を図10にまとめる。PoAb1の認識領域は図4からQ449stop以降W688stopまでの間あるいは全長部分にわたっていることが推察され、PoAb2は図5よりP285stop以降W387stop、またはこれ以降Tsp1-を認識しており、本ポリクローナル抗体PoAb1が中和活性を有すること (後述) 並びにPoAb2さらにはPoAb3もADAMTS-13の酵素活性を中和したため、これらの事実を併

せて鑑みるとSpacer領域よりN末端側、metalloprotease領域、Disintegrin-like領域、Tsp1-1領域、Cys-Spacer領域等がin vitroのアッセイにおいて機能的に重要であり中和領域となりえることが確認された。

実施例 6

(ELISAを利用した抗ADAMTS-13抗体のエピトープ領域の確認)

イムノモジュール96ウェルプレートに抗FLAG抗体10 μ g/mL 100 μ Lを固相化したのちFLAGをポリペプチド鎖に付加した ADAMTS-13 wild typeもしくは各種上記欠失変異体を固相化、もしくはFLAGの付加に無関係に直接プレートへ本酵素変異体を固相化し、公知の方法によりブロッキング操作を施したプレートに適当に希釈されたMoAbの100 μ Lを反応後、プレートをTweenなどの界面活性剤を含有するバッファーにて洗浄後、抗マウスIgHRPコンジュゲートと37℃一時間反応させ洗浄後、TMBZ等で発色させることにより、実施例5同様なエピトープ領域の絞り込みを行なった。その結果、実施例5で示された結果を支持した。また、この方法はヒト血漿中に存在する抗ADAMTS-13抗体の検出並びにエピトープ解析に有効であると考えられた。

実施例 7

(確立された抗体を用いてのウェスタンブロットによるヒト血漿中のADAMTS-13の検出)

続いて、上記種々の方法により調製された抗体を用いて、常法により (Current Protocols in Molecular Biology : Chapter 10 analysis of proteins, Chapter 11 immunologyなど)、本酵素のウェスタンブロット法による検出を行なった。本酵素のC末端領域のペプチド配列 (配列番号2) Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-SerをKLHに結合したものを免疫原として得られたペプチド抗体により、還元条件下、健常人血漿、TTP患者血漿中から本酵素の検出を行なったところ、一部のTTP患者血漿では明瞭ではないが、概ね250 kDa程度の本酵素由来のシグナルと想定されるバンドが確認された (図11)。

実施例 8

(確立された抗体を用いた酵素免疫測定法によるヒト血漿中のADAMTS-13の検出・測定1)

得られたポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合わせ (MoAb-PoAb の系) により (認識エピトープは図 10 参照) 構築される酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて (図 12)、様々な検体での本酵素の定量を行なった。測定方法の工程を以下に示す。

1. 各試薬類を室温に戻す。
2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
4. PoAb 1 またはPoAb 2を1 μ g/mlとなるよう希釈液 (1%BSA-TBS) にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
6. 抗ウサギIgG-HRP標識コンジュゲートを希釈液 (1%BSA-TBS) にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
8. TMB基質液 (直前に室温で2液を混ぜたもの) 100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは青色へ) 室温10分程度 (スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、最終的にOD450nm=1 程度となるように) 反応停止液 (0.5 M 硫酸) を100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは黄色へ)
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定

定量のためのスタンダードは遺伝子組換えADAMTS-13を後述する抗体によるアフィニティー精製により得られたものを用いた。その結果、健常人血漿中のADAMTS-13濃度は用いた抗体により変化することが明らかとなり、これは血漿中で本酵素が様々な分子形態で存在することを示唆するものであった (表1)。こ

のことから理想的なELISA系として、積極的に分解パターンを解析できるようなドメイン毎に認識する抗体群を利用した系もしくは表2に示すこれらの影響が少ないと考えられるPoAb—PoAb（ProteinG等で精製したPoAbを直接ELISAプレートへ固相化し、ビオチン化PoAb—ストレプトアビジンHRP）による系の構築が望ましいと考えられた（図13）。図13に示す系において、ポリクローナル抗体（PoAb）もしくはN末より（メタロプロテアーゼドメインなど）の認識エピトープを有するモノクローナル抗体（MoAb）を固相化に用いて、検出側の二次抗体にドメイン毎に異なるエピトープのMoAbを用いることで全てのバリエーションのADAMTS-13をトラップする。あるいは、この逆に様々なエピトープのMoAbを固相化に用いるあるいはPoAbとPoAbでのサンドイッチELISAなどが想定される。図に示すようにサンプル中のADAMTS-13は様々なバリエーションが存在する。これらの系で病態と血漿中の存在分子形態との相関を見ることが可能になる。

表 1

	MoAb (WH10) -PoAb1	MoAb (WH10) -PoAb2
Plasma 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml
Plasma 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml
Plasma 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml
TTPplasma	0 μ g/ml	0 μ g/ml

表 2

	PoAb1-PoAb1
Plasma 4	1.0 μ g/ml
Plasma 5	1.0 μ g/ml
Plasma 6	0.9 μ g/ml
Plasma 7	1.1 μ g/ml
Plasma 8	0.9 μ g/ml

Plasma 9	0.8 μ g/ml
----------	----------------

実施例 9

(確立された抗体を用いた酵素免疫測定法によるヒト血漿中のADAMTS-13の検出・測定 2)

得られたモノクローナル抗体を組み合わせることで構築される酵素免疫測定法 (MoAb-MoAbの系) (図 1 4) により、数検体のヒト血漿中の本酵素の定量を行った。測定方法の工程を以下に示す。

1. 各試薬類を室温に戻す。
 2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
 3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
 4. ビオチン化抗体を1 μ g/mlとなるよう希釈液 (1%BSA-TBS) にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
 5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
 6. スレプトアビジン-HRP標識コンジュゲートを希釈液 (1%BSA-TBS) にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
 7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
 8. TMB基質液 (直前に室温で2液を混ぜたもの) 100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは青色へ) 室温10分程度 (スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、最終的にOD450nm=1 程度となるように)
- 反応停止液 (0.5 M 硫酸) を100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは黄色へ)
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定

その結果を前述の実施例 5 に示す結果と比較すると、この組み合わせの系は最も低い定量値を示した (表 3)。また、この組み合わせでは後述するヒトプール

血漿のFIペーストから精製された本酵素を検出することは出来なかった。このことは、抗体の組み合わせにより定量値が変動するという事実を考慮すると抗体の組み合わせを変えた様々な系の構築（図13）の重要性を示している。

表 3

	MoAb (WH10) -PoAb1	MoAb (WH10) -PoAb2	MoAb (WH10) -MoAb (WH63-1)
Plasma 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml	0.13 μ g/ml
Plasma 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml	0.09 μ g/ml
Plasma 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml	0.09 μ g/ml
TTPplasma	0 μ g/ml	0 μ g/ml	0 μ g/ml

実施例 10

（遺伝子組換えADAMTS-13の発現）

ヒト胎児腎細胞株である293細胞を用いて組換えADAMTS-13の安定発現株を以下の方法で作出した(WO 02/088366)。概略として、以下の手順でトランスフェクトした。まず初めに $1-3 \times 10^5$ 個/35mm dishで細胞を撚き、その翌日に上記発現ベクターを2 μ g当たり10 μ lのPolyamine Transfection ReagentであるTransIT (TAKARA社製) をとり、Opti-MEM等の無血清培地200 μ lに添加して、試薬添付文書に従い、DNAとのコンプレックスを調製後、準備しておいた前記各種細胞へ滴下し、6時間インキュベーションし、その後、培地交換し、さらにその3日後G418添加選択培地に交換した。これからさらに3日毎に培地交換を行ない、選択されたコロニー群から限界希釈法及び先のMoAb (WH10) -PoAb1のELISA系を利用して、発現クローン (Clone No. VWFCP-293-35並びに293-2-4) を確立した。

実施例 11

（抗体を用いての遺伝子組換え体の培養上清からの遺伝子組換えADAMTS-13の精製）

得られた抗体の一例としてWH10を用いた例を示す。この抗体を適当な固定化担体に結合させることでアフィニティーカラムを作製し、当該酵素の精製に供した。アフィニティーカラムの調製には、チッソ社製NHS活性化セルロファインを用い

て、添付文書に従い抗体を固定化した。これにより調製した約 1 ml の膨潤担体を用いて、実施例 9 に示す当該酵素の 293 細胞を宿主とした遺伝子組換え体の発現培養上清をアブライしたのち、50mM Tris-HCl 0.1M NaCl pH7.5 (以下TBS) でカラムを洗浄後、0.1MグリシンpH3バッファーで溶出した。溶出された画分を 1M Tris-HCl pH8.5にて中和し、TBSに対して透析した。得られた精製酵素のSDS-PAGEを図 15 に示す。また、得られた精製画分に vWF を切断する活性が存在することも確認された。そして、この組換え酵素により断片化された vWF の切断点は、その断片のN末端アミノ酸配列解析から842Tyr-843Metの位置であることが確認された。

続いて精製された組換え体由来のADAMTS-13の部分アミノ酸配列を決定した。常法により、SDS-PAGE後、PVDF膜へトランスファーし、風乾したのち、PEアブライドバイオシステムズ社のオートプロテインシーケンサー492にて解析を行なった。その結果、部分N末端配列としてAla-Ala-Gly-Gly-Ile-を有することが明らかとなった。この配列は、遺伝子構造から推定された当該酵素の成熟体のN末端配列に一致した。

実施例 12

(抗体を用いてのヒトプール血漿由来FIペーストからのADAMTS-13の精製)

FIペーストの可溶化

FIペーストは12gずつに小分けし凍結保存した。使用する前日に4℃に出して融解させ、翌日、可溶化バッファー(0.05% アザイド、50 mM Tris-HCl pH7.4、100 mM NaCl)を10 mg/mLになるよう、120mL加え37℃で2時間攪拌した。10000rpmで10分間遠心した後、上清を回収し、プレフィルター、5.0μmフィルター、0.8μmフィルターの順でろ過したものを可溶化サンプルとした。

vWF切断酵素のゲルろ過クロマトグラフィー

可溶化したFIペーストを、セファクリルS-300HR(アマシャムファルマシア)の5×90cmカラムにかけ、1回目のゲルろ過を行なった。可溶化バッファーと同じ0.05% アザイド、50 mM Tris-HCl pH7.4、100 mM NaCl(以後溶出バッファー)を用い、流速は5 mL/min.、分取は推定分子量100k~300kDaに相当する画分をプー

ルし、これに、終濃度33%飽和となるよう飽和硫酸を少量ずつ滴下した。これをさらに一晚4℃に静置した。翌日10000rpm、10分遠心し、目的の活性画分を沈殿として回収した。以上の可溶化・ゲルろ過・硫酸沈殿の操作を5バッチ行ない、-20℃で凍結保存した。

1回目のゲルろ過によって得られた硫酸沈殿物2~3バッチ分を、溶出バッファ-50mLに溶解し1回目と同様セファクリルS-300HRカラム(5×90cm)に通液し、2回目のゲルろ過を行なった。溶出バッファ、条件、操作等については1回目と同様である。この操作を2回実施した。

2回目のゲルろ過によって得られた硫酸沈殿物2回分を、溶出バッファ-50mLに溶解し、1、2回目と同様、セファクリルS-300HRカラム(5×90cm)にかけ、3回目のゲルろ過を実施した。溶出バッファ、条件、操作等については1、2回目と同様である。そして推定分子量100k~300kDaに相当する画分をプールした。このプールサンプルを前述のリコンビナントADAMTS-13精製と同様の手順にてClone No. WH10モノクローナル抗体固定化カラムを用いて精製を行なった。その結果、図16に示されるようにSDS-PAGEにて105kDa~160kDaのサイズを有するほぼ単一のADAMTS-13が精製された。このN末端アミノ酸配列を解析したところリコンビナントと同様の結果が得られた。

実施例13

(抗体による本酵素活性の中和)

前述の家兎ポリクローナル抗体によるvWF切断酵素の中和活性を評価した。遺伝子組換えADAMTS-13の1~10 μ g/mL(ブラッドフォード法にて概算)に対して、正常家兎血清、C末端領域のペプチド配列(配列番号2)Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-SerをKLHに結合したものを免疫原として得られた家兎抗血清、及び全長ADAMTS-13発現ベクターにより発現された蛋白質により免疫誘導された抗血清(PoAb1)のそれぞれを体積比1対1あるいは10倍希釈した抗血清を1対1で予め37℃で1時間反応させた後、前述したvWF切断活性のアッセイに供し、その活性の阻害を評価した。

その結果、図17に示すごとく本酵素の阻害活性を有するものが調製された（メタロプロテアーゼのインヒビターであるEDTAを阻害の陽性コントロールとした。）。また、中和活性を有するポリクローナル抗体(PoAb1)のエピトープ解析の結果（図4）から、ADAMTS-13のドメイン構造中のSpacer領域よりN末側に中和エピトープが存在することが推察された。またさらに、PoAb2並びにPoAb3においても中和能を有することが確認された。これらのことから、中和可能領域として、metalloprotease領域、Disintegrin-like領域なども想定された。このように中和抗体が作成可能であるということは、vWF切断酵素に対する自己抗体陽性の後天的TTP患者様のモデルを構築できる可能性も示唆している。

実施例14

（ヒト血漿中の抗ADAMTS-13抗体の検出）

実施例6に示す方法を利用し、後天性TTP患者血漿中の抗ADAMTS-13抗体の検出を行った。イムノモジュール96ウェルプレートに抗FLAG抗体 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 μL を固相化したのちFLAGをポリペプチド鎖に付加したADAMTS-13 wild typeを反応させたのち、5、10、50倍希釈された検体100 μL を37℃一時間反応後、プレートを0.05%Tween20を含むトリスバッファーにて洗浄後、抗ヒトIgHRPコンジュゲートと37℃一時間反応させ洗浄後、TMBZ等で発色させた。その結果、図18に示されるように後天性のTTP患者血漿（Acquired）のみが正常血漿（Normal）並びに先天性TTP血漿（Congenital）に比べ450nmの吸光度において突出した値を示し、抗ADAMTS-13抗体を有することが確認された。

実施例15

（抗マウスADAMTS-13ポリクローナル抗体（PoAb）の作製）

ヒト同様マウスの本酵素をコードする遺伝子（WO 02/088366）を常法にしたがい導入した発現ベクターをウサギの皮下・皮内または筋肉内にトランスフェクトし、ポリクローナル抗体（PoAb）の作出を行なった。得られた抗体を用いてマウス血漿中より本酵素を免疫沈降させ検出した（図19）。マウスの系統により本酵素の分子サイズが異なることが認められた。また、本ポリクローナル抗体をプレートに固相化し、さらにはビオチン化することでPoAb-PoAbのサンドウィッチ

ELISAを構築した（表4）。これにより本酵素の血中存在量の測定がマウスでも可能になる。

表 4

450nm-650nm値	x 5	x 1 0	x 2 0	x 4 0	Buffer (Blank)
組換え体発現濃縮上清	0.809	0.554	0.341		0.087
Balb/c プラズマ			0.257	0.180	
ICR プラズマ			0.375	0.279	

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

産業上の利用可能性

本願発明の抗体は、ADAMTS-13に対して特異的に免疫反応性を示す。したがってADAMTS-13酵素量の迅速な検出、本酵素変動に伴う疾病の診断及びADAMTS-13の効率的な精製あるいはADAMTS-13の酵素活性の中和が可能となる。このように、本願発明の抗体は、ADAMTS-13の検出及び精製をはじめとする多種多様の用途を有するものでもある。斯くも有用なこの発明の抗体はこの発明による抗体の製造方法により所望量を容易に得ることができる。

本願発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。また、本願発明のADAMTS-13部分欠失体も機能上重要な領域の決定等に利用することができる。さらにこれら酵素分子を利用した試料中の本酵素に対する抗体の存在の有無の判定が可能となり、

血小板減少症のより詳細な原因究明の手段を提供し、これによりあやまった血小板輸注のリスクを回避可能にするものである。

請求の範囲

1. フォンビルブランド因子特異的切断酵素（以下、ADAMTS-13と称することがある）を構成するアミノ酸配列のうち全長または1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質またはペプチドに対する抗体。
2. ADAMTS-13が霊長類または齧歯類を起源とするものである請求項1記載の抗体。
3. 配列番号1記載のADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質に対する抗体。
4. 配列番号1記載のADAMTS-13を構成するアミノ酸配列よりなるポリペプチドに対し、当該ポリペプチドのSpacer領域よりN末端側またはMetalloprotease領域、Disintegrin-like領域、Tspl-1領域、Cys-rich領域からSpacer領域の間を認識する抗体。
5. 請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体であって、ADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質のアフィニティー精製に用いられ得る抗体。
6. 請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体であって、ADAMTS-13を構成するアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記のいずれかのアミノ酸配列の部分配列もしくは前記アミノ酸配列を含有するポリペプチド鎖よりなる蛋白質が有する酵素活性を阻害もしくは中和し得る抗体。
7. ADAMTS-13のSpacer領域よりN末端側、Metalloprotease領域またはDisintegrin-like領域を認識する請求項6記載の抗体。

8. 配列番号 2 及び 3 の ADAMTS-13 部分ペプチドを含有してなる免疫原により調製された抗体。

9. 配列番号 1 記載のポリペプチド鎖の全長あるいはその一部の発現物を免疫あるいはそれを発現する発現ベクターを直接動物にトランスフェクトし得られる抗体。

10. ポリクローナル抗体である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

11. モノクローナル抗体である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の抗体並びにその抗体をコードする遺伝子。

12. ハイブリドーマ株 WH10 (受託番号 FERM BP-8174)、ハイブリドーマ株 WH63.1 (受託番号 FERM BP-8175)、ハイブリドーマ株 WHS 40.3 (受託番号 FERM BP-8176)、ハイブリドーマ株 Pep4-34.1 (受託番号 FERM BP-8177)、ハイブリドーマ株 WH2-22-1A (受託番号 FERM BP-8483)、ハイブリドーマ株 WH2-1-1 (受託番号 FERM BP-8484)、ハイブリドーマ株 WH2-11-1 (受託番号 FERM BP-8485)、ハイブリドーマ株 Pep6-6A (受託番号 FERM BP-8474) およびハイブリドーマ株 Pep4-5B-1 (受託番号 FERM BP-8475) からなる群から選択されるハイブリドーマが産生する抗体である請求項 9 記載のモノクローナル抗体並びにこの抗体をコードする遺伝子。

13. 請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の抗体によって認識される ADAMTS-13 のエピトープに結合または競合的に結合することができる抗体。

14. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む医薬品組成物または診断薬。

15. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を構成成分とする標識蛋白質。

16. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生し得る単離された細胞。

17. ハイブリドーマである請求項16に記載の細胞。
18. ハイブリドーマ株WH10（受託番号FERM BP-8174）、ハイブリドーマ株WH63.1（受託番号FERM BP-8175）、ハイブリドーマ株WHS 40.3（受託番号FERM BP-8176）、ハイブリドーマ株Pep4-34.1（受託番号FERM BP-8177）、ハイブリドーマ株WH2-22-1A（受託番号FERM BP-8483）、ハイブリドーマ株WH2-1-1（受託番号FERM BP-8484）、ハイブリドーマ株WH2-11-1（受託番号FERM BP-8485）、ハイブリドーマ株Pep6-6A（受託番号FERM BP-8474）およびハイブリドーマ株Pep4-5B-1（受託番号FERM BP-8475）からなる群から選択される請求項17記載の細胞。
19. 請求項1から13のいずれか1項に記載の抗体を含んでなる免疫測定キット。
20. ADAMTS-13のアミノ酸配列の一部または全部を含むポリペプチドで温血動物を免疫感作する工程と、該免疫感作された温血動物の体液から請求項1から13のいずれか1項に記載の抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。
21. 温血動物を免疫感作するためのポリペプチドが、ADAMTS-13の一部として、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の一部または全部を含む請求項20に記載の抗体の製造方法。
22. 請求項1から13のいずれか1項に記載の抗体を産生し得る単離された細胞を生体内または生体外で培養する工程と、その体液または培養物から該抗体を採取する工程を含む抗体の製造方法。
23. 抗体を産生し得る単離された細胞がハイブリドーマである請求項22に記載の抗体の製造方法。
24. 塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる1種または2種以上を含む精製方法により抗体を採取する請求項20から23のい

ずれか 1 項に記載の抗体の製造方法。

25. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を被験試料に接触させ、免疫反応により ADAMTS-13を検出することを特徴とする ADAMTS-13の検出方法。

26. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を利用するラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイである請求項 25 に記載の検出方法。

27. 被験試料が生体から採取した生物学的試料である請求項 25 または 26 に記載の検出方法。

28. 請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を ADAMTS-13と夾雑物質とを含む混合物に接触させて抗体に当該蛋白質を吸着させる工程と、吸着した当該蛋白質を抗体から脱着させる工程を含む ADAMTS-13の精製方法。

29. 抗体が水不溶性担体に結合している請求項 28 に記載の精製方法。

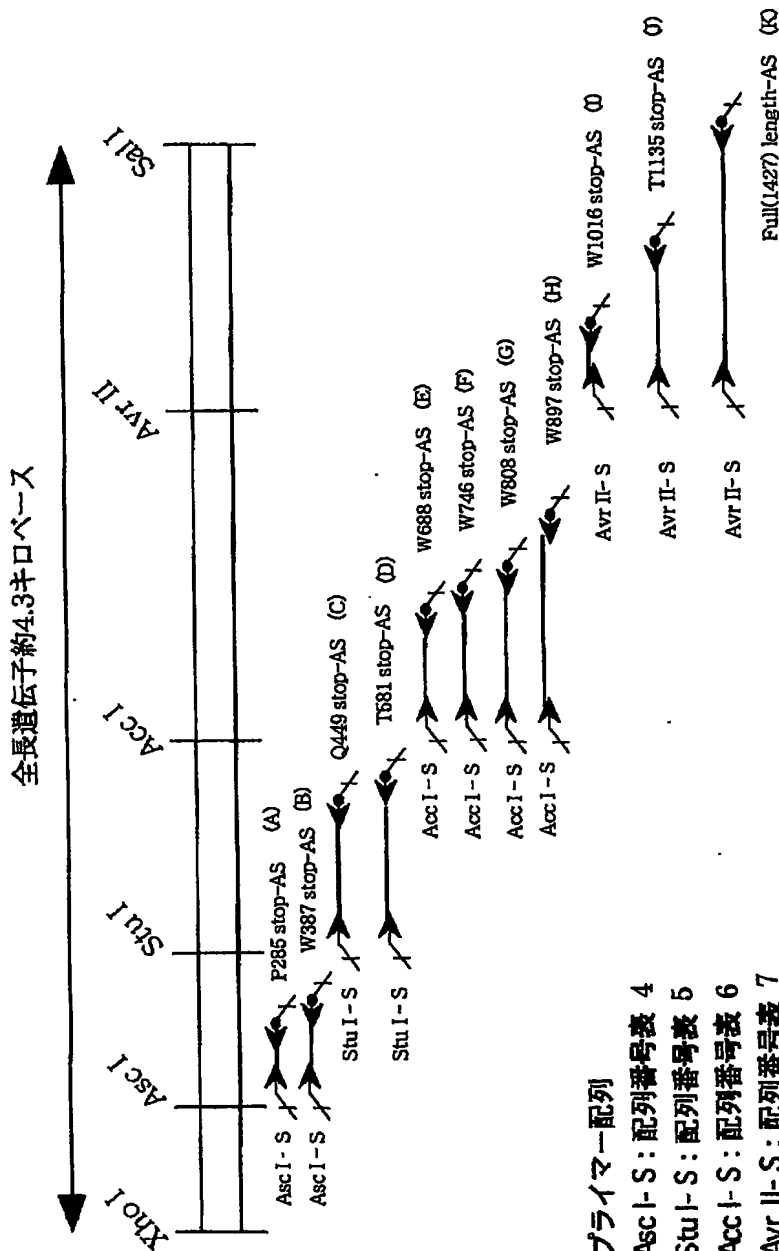
30. ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とする診断薬あるいは医薬品。

31. ADAMTS-13の Spacer から N 末端側、あるいは metalloprotease 領域、Disintegrin-like 領域、Tspl-1 領域、Cys-rich 領域から Spacer 領域を主成分とする請求項 30 記載の診断薬あるいは医薬品。

32. ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とした当該ポリペプチド鎖に対する抗体検出用の試薬・診断薬または医薬品。

33. ADAMTS-13の全長もしくは部分欠失変異体を主成分とした抗体検出またはエピトープ解析用抗原の利用及びその調製法。

図 1



プライマー配列

- Asc I-S : 配列番号表 4
- Stu I-S : 配列番号表 5
- Acc I-S : 配列番号表 6
- Avr II-S : 配列番号表 7
- P285stop-AS : 配列番号表 8
- W387stop-AS : 配列番号表 9
- Q449stop-AS : 配列番号表 10
- T581stop-AS : 配列番号表 11
- W688stop-AS : 配列番号表 12
- W746stop-AS : 配列番号表 13
- W808stop-AS : 配列番号表 14
- W897stop-AS : 配列番号表 15
- W1016stop-AS : 配列番号表 16
- T1135stop-AS : 配列番号表 17
- Full(1427) length-AS : 配列番号表 18

c 末端欠失ベクター調整アンチセンスプライマー
 FLAG : gactacaaggcagtgacgataagtgga 配列番号表 19
 AspTyrLysAspAspLys * 配列番号表 20
 Sal I site

各PCRフラグメント(A)~(K)をライゲーション

図 1

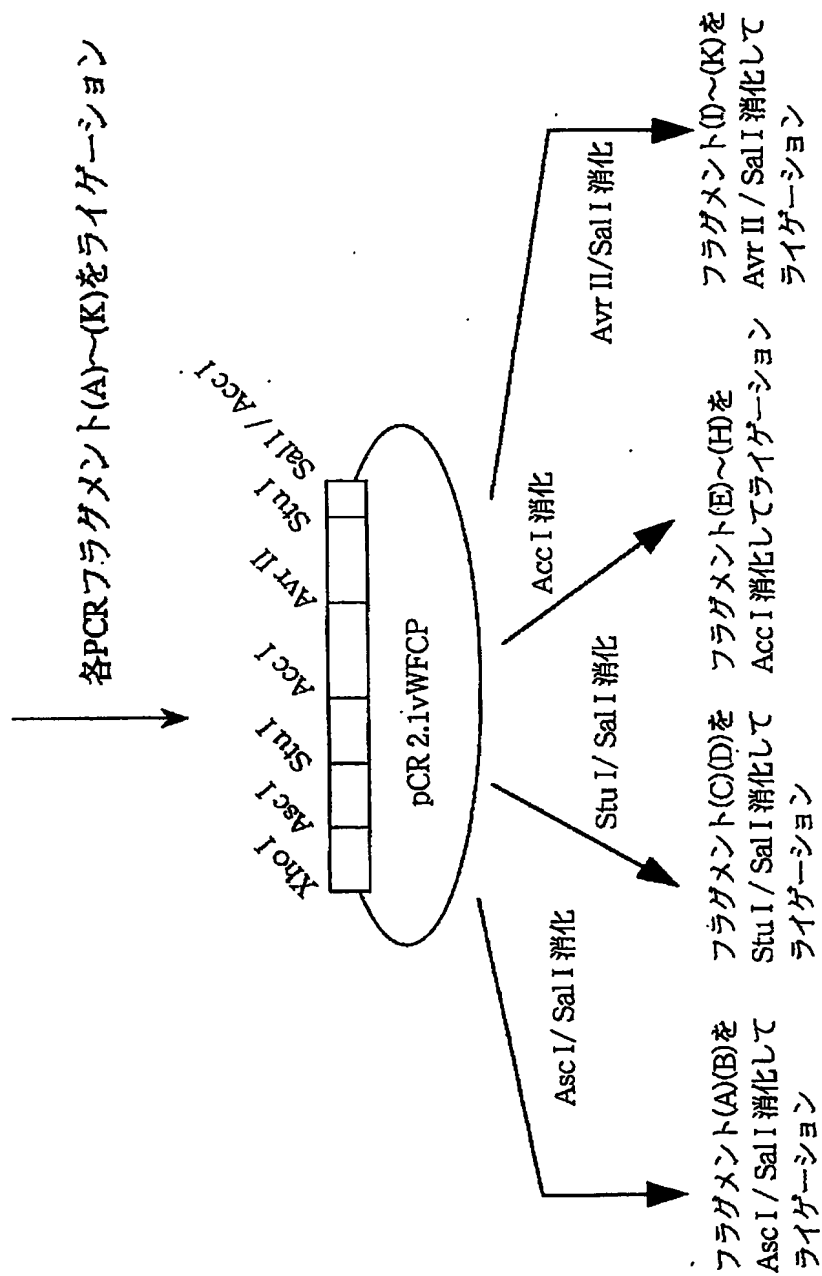


図 2

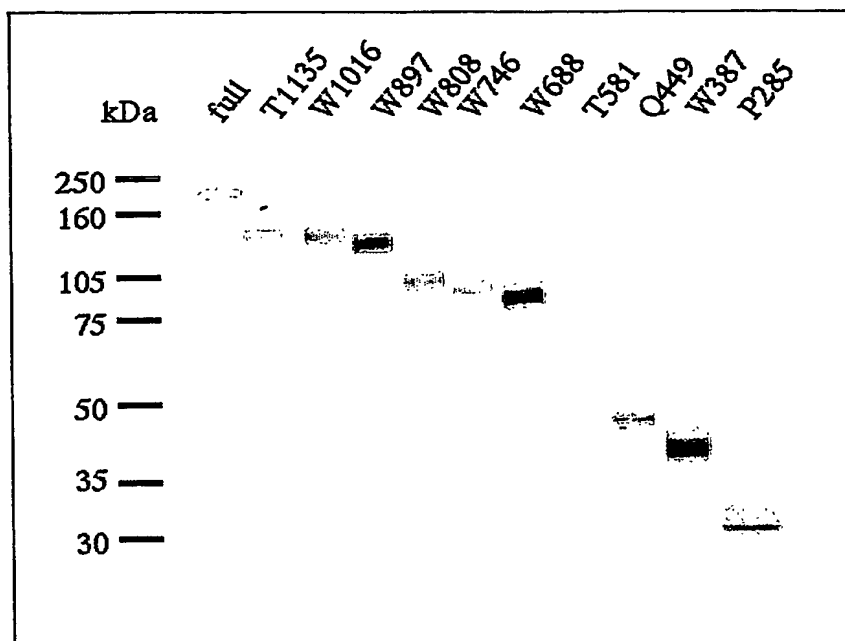


図 3

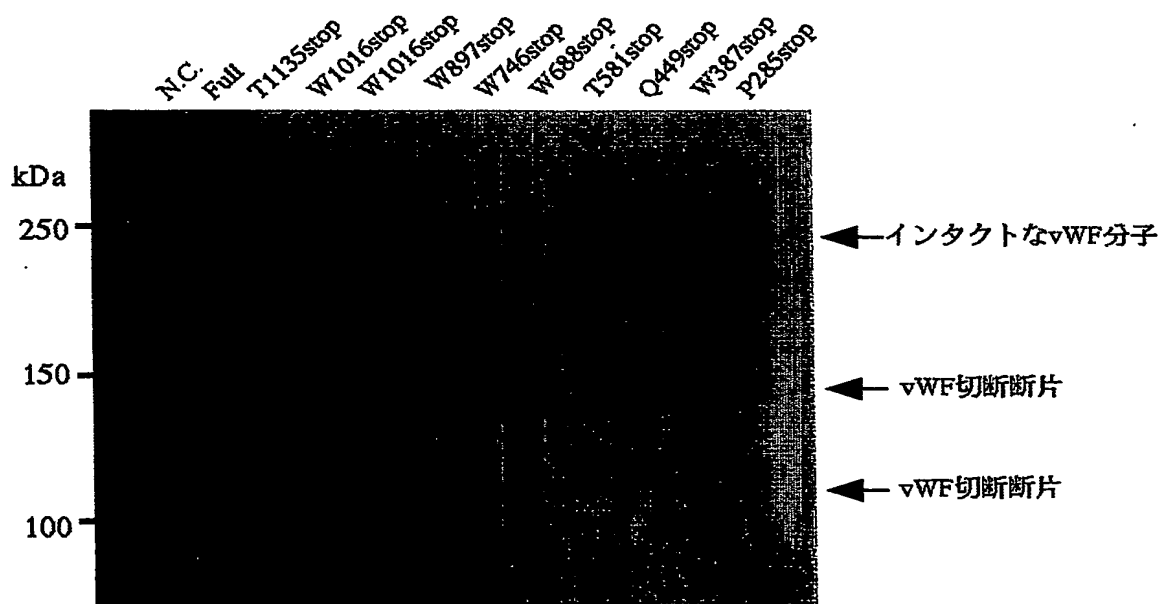


図 4

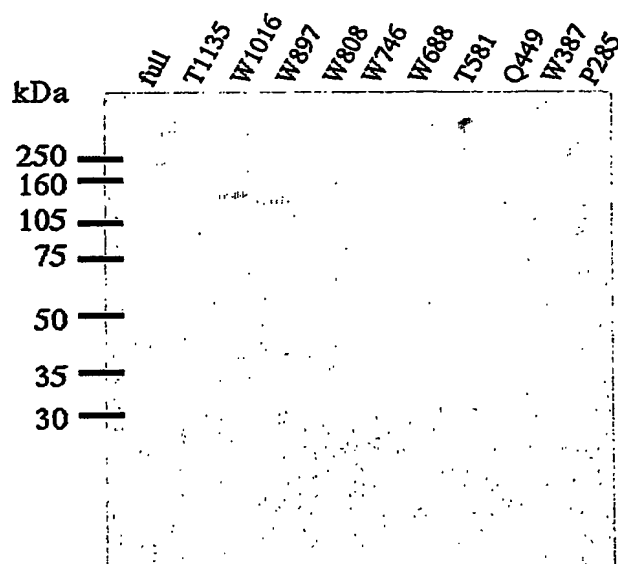


図 5

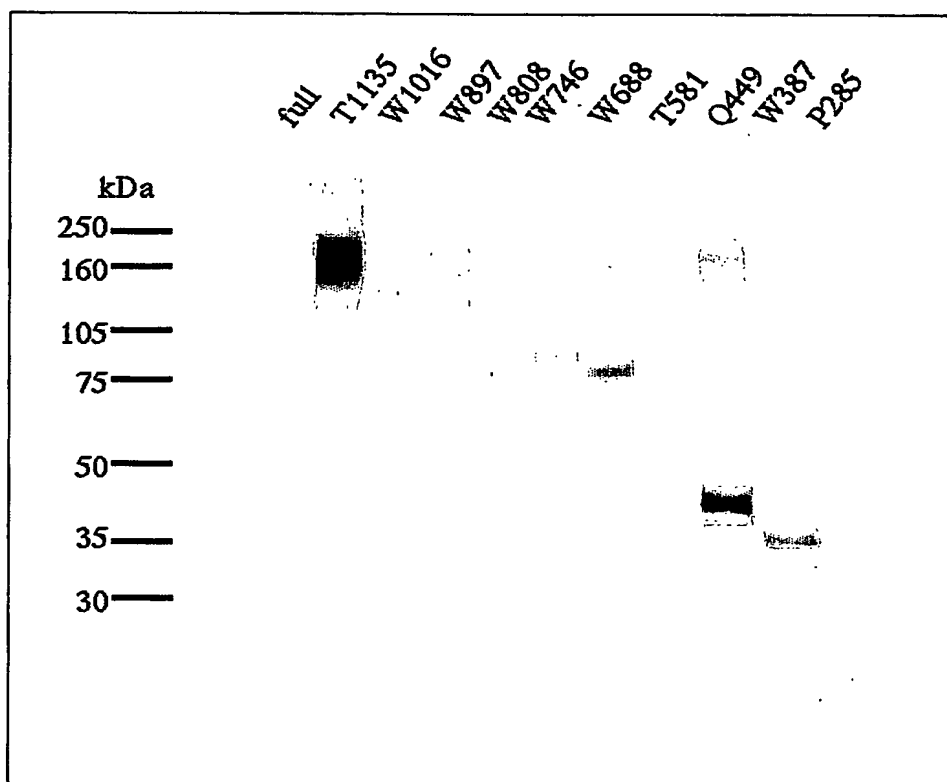


図 6

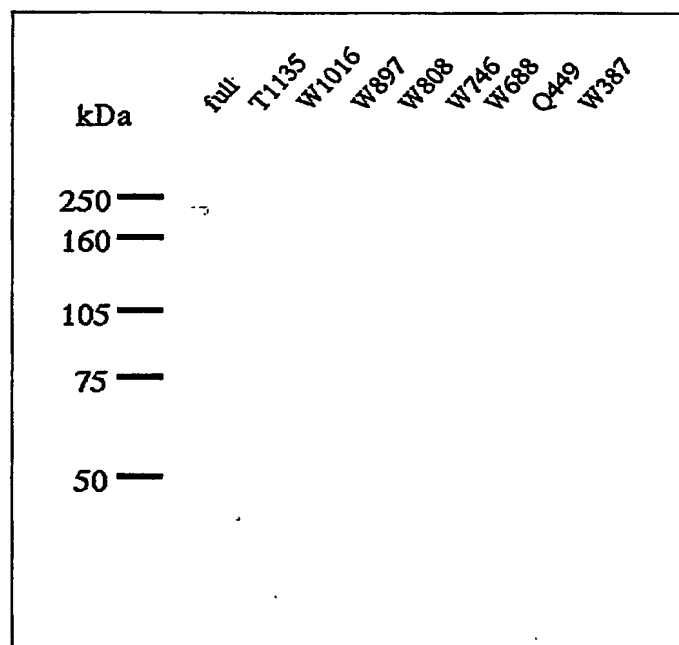


図 7

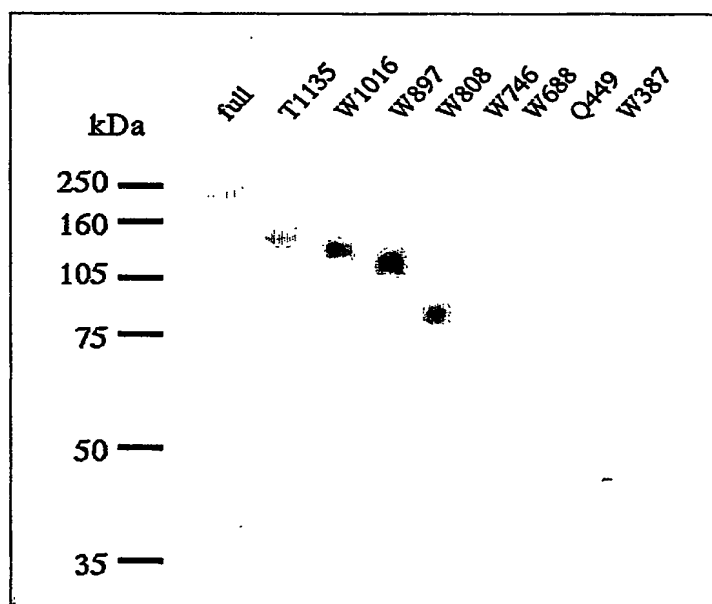


図 8

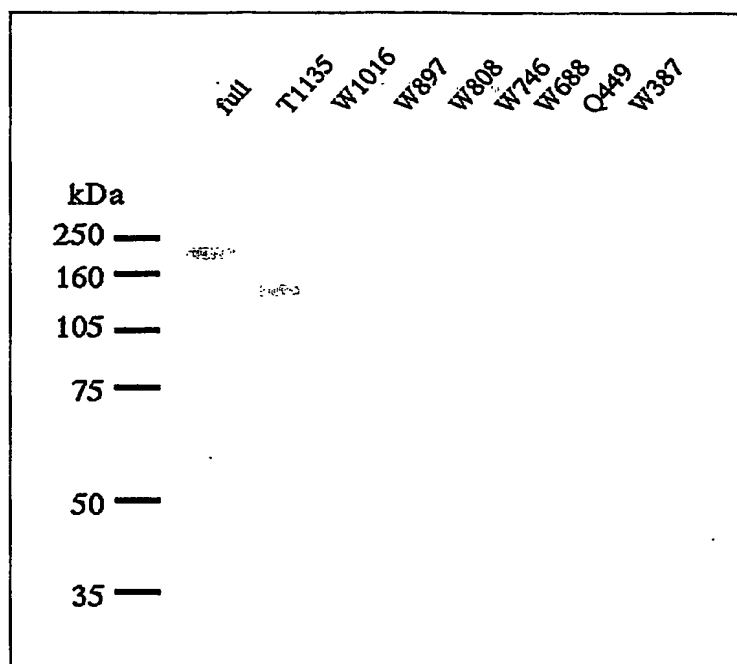


図 9

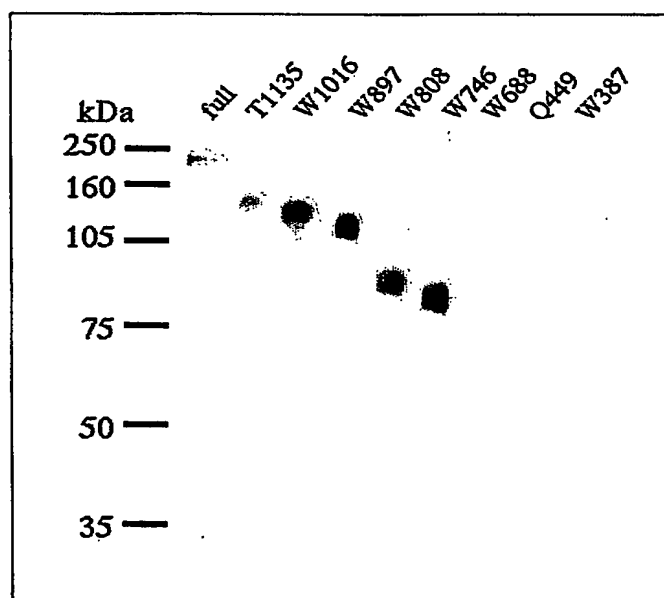


図 10

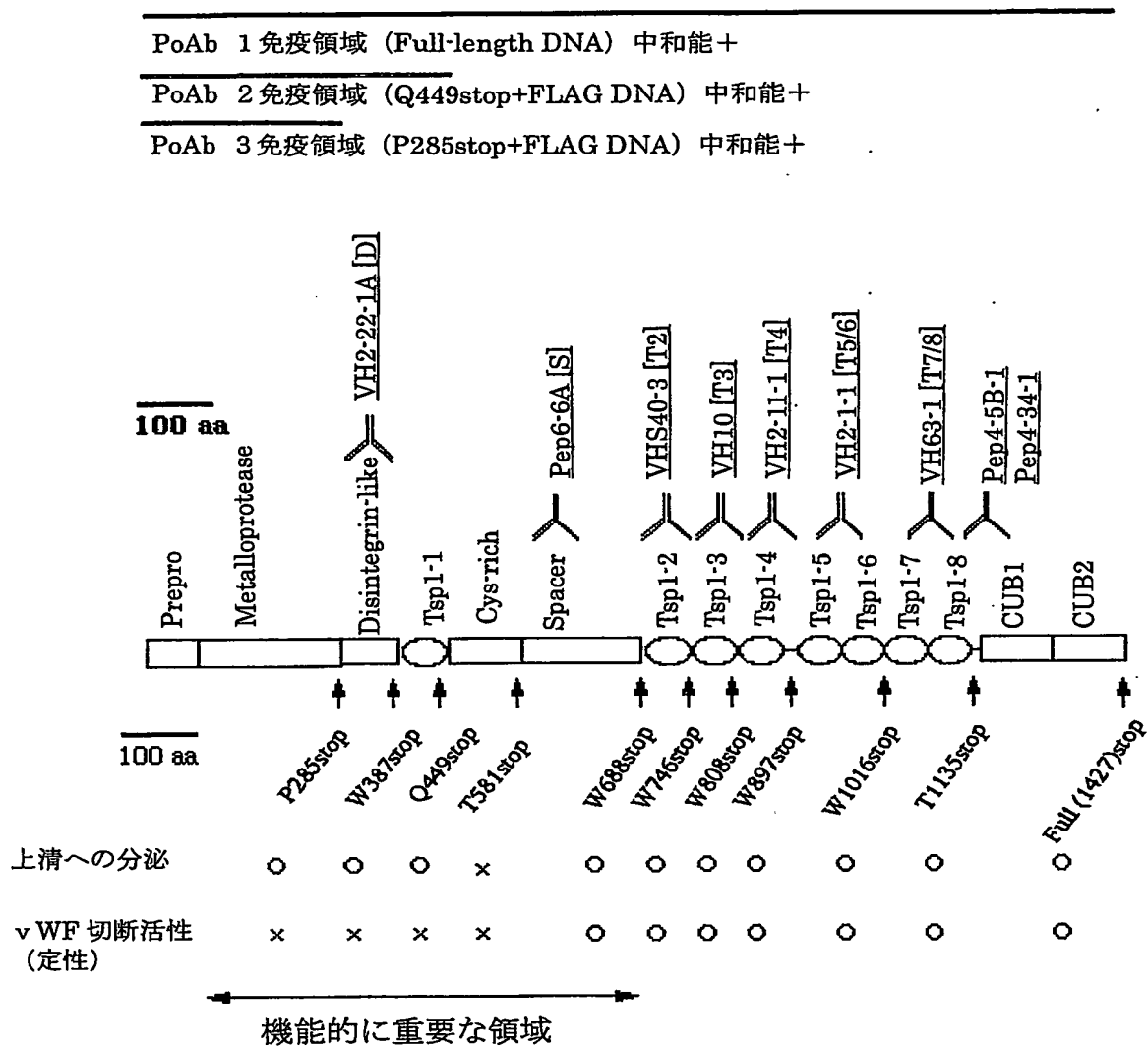
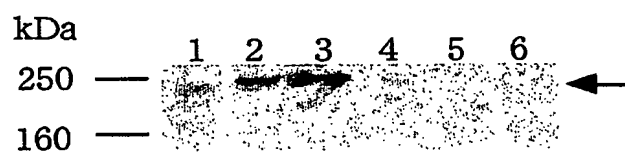


図 1 1



1. ヒトプールプラズマのF Iペーストのゲル濾過サンプル
2. 健常人血漿1
3. 健常人血漿2
4. 健常人血漿3
5. TTP患者血漿1
6. TTP患者血漿2

図 1 2

【MoAb-PoAbの系】

1. 各試薬類を室温に戻す。
2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
4. PoAb 1 またはPoAb 2を1 μ g/mlとなるよう希釈液（1%BSA-TBS）にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
6. 抗ウサギIgG-HRP標識コンジュゲートを希釈液（1%BSA-TBS）にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
8. TMB基質液（直前に室温で2液を混ぜたもの）100 μ l/ウェル添加（ポジティブウェルは青色へ）
室温10分程度（スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、
最終的にOD450nm=1 程度となるように）
9. 反応停止液（0.5 M 硫酸）を100 μ l/ウェル添加（ポジティブウェルは黄色へ）
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定

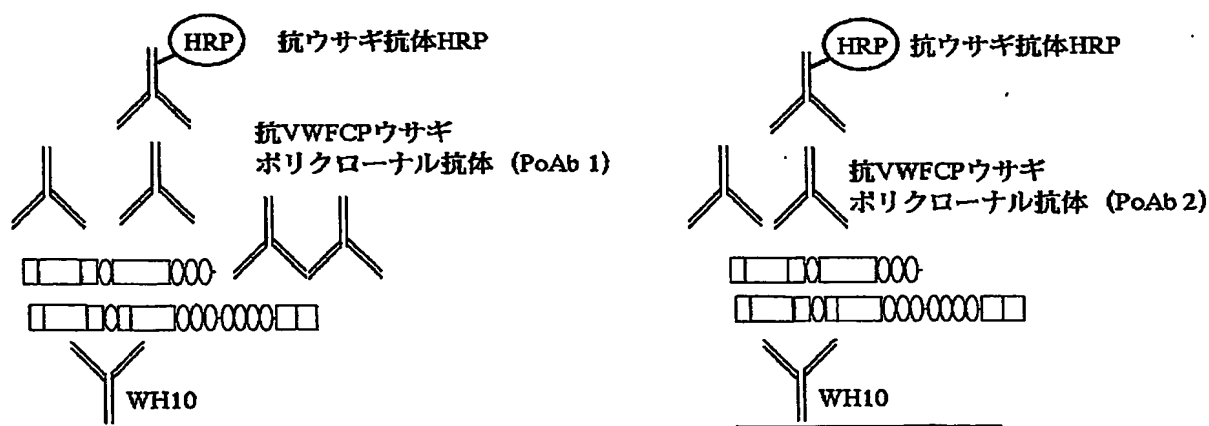


図 1 3

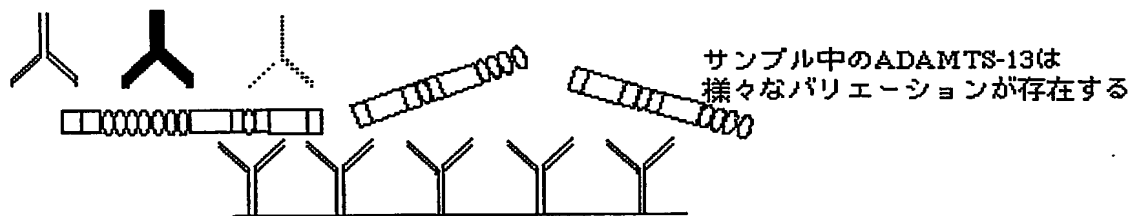


図 1 4

【MoAb-MoAbの系】

1. 各試薬類を室温に戻す。
2. WH10 MoAb固定化プレートにサンプルを100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
3. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
4. ビオチン化抗体を1 μ g/mlとなるよう希釈液 (1%BSA-TBS) にて希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
5. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
6. ストレプトアビジン-HRP標識コンジュゲートを希釈液 (1%BSA-TBS) にて10000倍希釈し、100 μ l/ウェル添加
37°C 1時間
7. 0.05% Tween-20 -TBSでプレート洗浄3回
8. TMB基質液 (直前に室温で2液を混ぜたもの) 100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは青色へ)
室温10分程度 (スタンダードとして同封の組み換え品100ng/mlの色が反応停止後、
最終的にOD450nm=1 程度となるように)
9. 反応停止液 (0.5 M 硫酸) を100 μ l/ウェル添加 (ポジティブウェルは黄色へ)
9. プレートリーダーにて450nm及び650nm測定

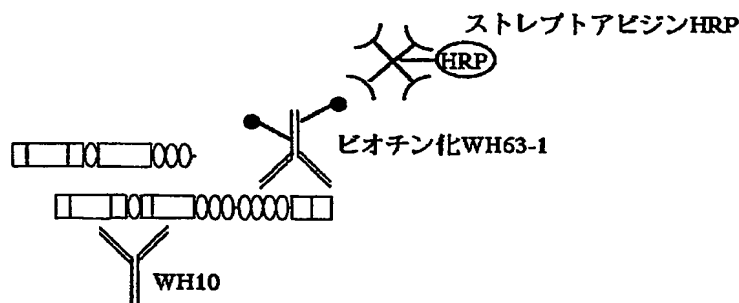


図 1 5

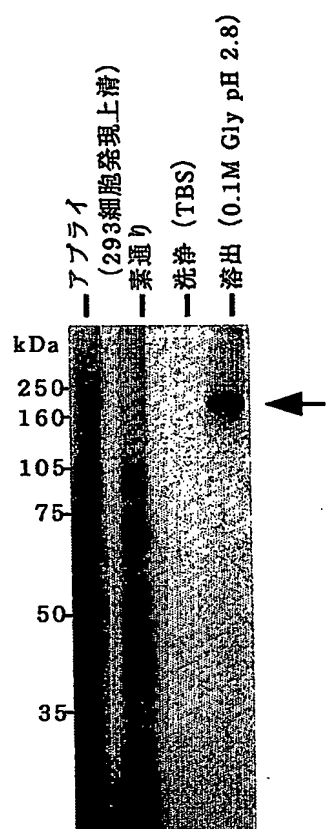


図 16

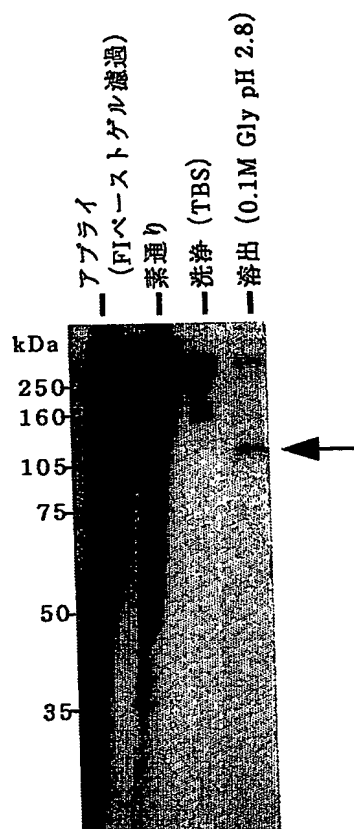
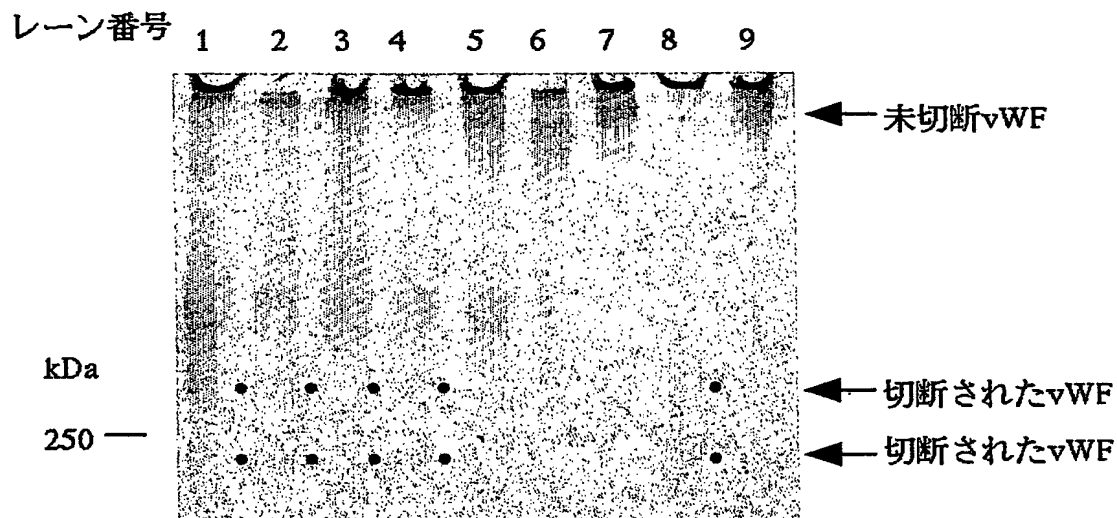


図 1 7



- 1.vWF切断酵素液：正常家兎血清=1：1
- 2.vWF切断酵素液：正常家兎血清（5倍希釈）=1：1
- 3.vWF切断酵素液：ペプチド免疫家兎血清=1：1
- 4.vWF切断酵素液：ペプチド免疫家兎血清（5倍希釈）=1：1
- 5.vWF切断酵素液：組換え蛋白免疫家兎血清=1：1
- 6.vWF切断酵素液：組換え蛋白免疫家兎血清（5倍希釈）=1：1
- 7.vWF切断酵素液：10 mM EDTA=1：1
- 8.vWF切断酵素液：バッファーのみ=1：1
- 9.バッファー（vWF切断酵素なし）：バッファー=1：1

図 18

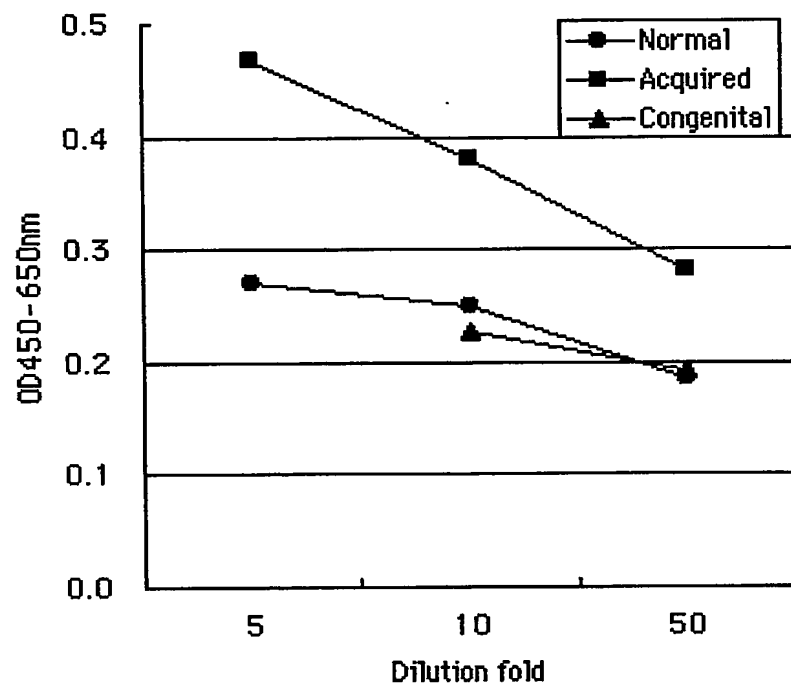
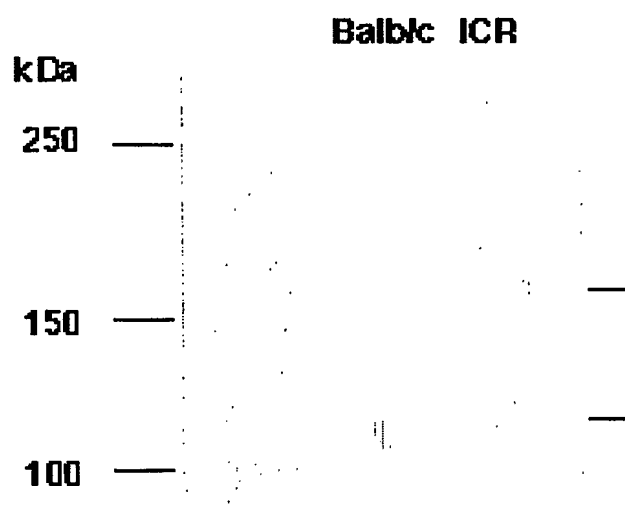


図 1.9



SEQUENCE LISTING

<110>JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120>Antibody against von Willebrand Factor cleaving protease and the assay method using the antibody thereof

<130>PH-1893-PCT

<150> JP 2002/279924

<151> 2002-09-25

<150> JP 2002/377569

<151> 2002-12-26

<160>19

<210>1

<211>1427

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Met His Gln Arg His Pro Arg Ala Arg Cys Pro Pro Leu Cys Val

1 5 10 15

Ala Gly Ile Leu Ala Cys Gly Phe Leu Leu Gly Cys Trp Gly Pro

20 25 30

Ser His Phe Gln Gln Ser Cys Leu Gln Ala Leu Glu Pro Gln Ala

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ser Pro Gly Ala Pro Leu Lys Gly Arg Pro

50 55 60

Pro Ser Pro Gly Phe Gln Arg Gln Arg Gln Arg Arg Ala		
65	70	75
Ala Gly Gly Ile Leu His Leu Glu Leu Leu Val Ala Val Gly Pro		
80	85	90
Asp Val Phe Gln Ala His Gln Glu Asp Thr Glu Arg Tyr Val Leu		
95	100	105
Thr Asn Leu Asn Ile Gly Ala Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ser Leu		
110	115	120
Gly Ala Gln Phe Arg Val His Leu Val Lys Met Val Ile Leu Thr		
125	130	135
Glu Pro Glu Gly Ala Pro Asn Ile Thr Ala Asn Leu Thr Ser Ser		
140	145	150
Leu Leu Ser Val Cys Gly Trp Ser Gln Thr Ile Asn Pro Glu Asp		
155	160	165
Asp Thr Asp Pro Gly His Ala Asp Leu Val Leu Tyr Ile Thr Arg		
170	175	180
Phe Asp Leu Glu Leu Pro Asp Gly Asn Arg Gln Val Arg Gly Val		
185	190	195
Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys Ser Pro Thr Trp Ser Cys Leu Ile		
200	205	210
Thr Glu Asp Thr Gly Phe Asp Leu Gly Val Thr Ile Ala His Glu		
215	220	225
Ile Gly His Ser Phe Gly Leu Glu His Asp Gly Ala Pro Gly Ser		
230	235	240
Gly Cys Gly Pro Ser Gly His Val Met Ala Ser Asp Gly Ala Ala		
245	250	255
Pro Arg Ala Gly Leu Ala Trp Ser Pro Cys Ser Arg Arg Gln Leu		
260	265	270

Leu Ser Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ala Arg Cys Val Trp Asp Pro		
275	280	285
Pro Arg Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly His Pro Pro Asp Ala Gln		
290	295	300
Pro Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asn Glu Gln Cys Arg Val Ala Phe		
305	310	315
Gly Pro Lys Ala Val Ala Cys Thr Phe Ala Arg Glu His Leu Asp		
320	325	330
Met Cys Gln Ala Leu Ser Cys His Thr Asp Pro Leu Asp Gln Ser		
335	340	345
Ser Cys Ser Arg Leu Leu Val Pro Leu Leu Asp Gly Thr Glu Cys		
350	355	360
Gly Val Glu Lys Trp Cys Ser Lys Gly Arg Cys Arg Ser Leu Val		
365	370	375
Glu Leu Thr Pro Ile Ala Ala Val His Gly Arg Trp Ser Ser Trp		
380	385	390
Gly Pro Arg Ser Pro Cys Ser Arg Ser Cys Gly Gly Gly Val Val		
395	400	405
Thr Arg Arg Arg Gln Cys Asn Asn Pro Arg Pro Ala Phe Gly Gly		
410	415	420
Arg Ala Cys Val Gly Ala Asp Leu Gln Ala Glu Met Cys Asn Thr		
425	430	435
Gln Ala Cys Glu Lys Thr Gln Leu Glu Phe Met Ser Gln Gln Cys		
440	445	450
Ala Arg Thr Asp Gly Gln Pro Leu Arg Ser Ser Pro Gly Gly Ala		
455	460	465
Ser Phe Tyr His Trp Gly Ala Ala Val Pro His Ser Gln Gly Asp		
470	475	480

Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile Gly Glu Ser Phe Ile		
485	490	495
Met Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr Arg Cys Met Pro		
500	505	510
Ser Gly Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys Val Ser Gly		
515	520	525
Ser Cys Arg Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser Gln Gln		
530	535	540
Val Trp Asp Arg Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr Cys		
545	550	555
Ser Pro Arg Lys Gly Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr		
560	565	570
Val Thr Phe Leu Thr Val Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile		
575	580	585
Ala Asn His Arg Pro Leu Phe Thr His Leu Ala Val Arg Ile Gly		
590	595	600
Gly Arg Tyr Val Val Ala Gly Lys Met Ser Ile Ser Pro Asn Thr		
605	610	615
Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Asp Gly Arg Val Glu Tyr Arg Val		
620	625	630
Ala Leu Thr Glu Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile		
635	640	645
Trp Gly Pro Leu Gln Glu Asp Ala Asp Ile Gln Val Tyr Arg Arg		
650	655	660
Tyr Gly Glu Glu Tyr Gly Asn Leu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Phe		
665	670	675
Thr Tyr Phe Gln Pro Lys Pro Arg Gln Ala Trp Val Trp Ala Ala		
680	685	690

Val Arg Gly Pro Cys Ser Val Ser Cys Gly Ala Gly Leu Arg Trp		
695	700	705
Val Asn Tyr Ser Cys Leu Asp Gln Ala Arg Lys Glu Leu Val Glu		
710	715	720
Thr Val Gln Cys Gln Gly Ser Gln Gln Pro Pro Ala Trp Pro Glu		
725	730	735
Ala Cys Val Leu Glu Pro Cys Pro Pro Tyr Trp Ala Val Gly Asp		
740	745	750
Phe Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly Gly Leu Arg Glu Arg		
755	760	765
Pro Val Arg Cys Val Glu Ala Gln Gly Ser Leu Leu Lys Thr Leu		
770	775	780
Pro Pro Ala Arg Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala Val Ala		
785	790	795
Leu Glu Thr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Pro Ala Arg Trp Glu Val		
800	805	810
Ser Glu Pro Ser Ser Cys Thr Ser Ala Gly Gly Ala Gly Leu Ala		
815	820	825
Leu Glu Asn Glu Thr Cys Val Pro Gly Ala Asp Gly Leu Glu Ala		
830	835	840
Pro Val Thr Glu Gly Pro Gly Ser Val Asp Glu Lys Leu Pro Ala		
845	850	855
Pro Glu Pro Cys Val Gly Met Ser Cys Pro Pro Gly Trp Gly His		
860	865	870
Leu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu Lys Ala Pro Ser Pro Trp Gly		
875	880	885
Ser Ile Arg Thr Gly Ala Gln Ala Ala His Val Trp Thr Pro Ala		
890	895	900

Ala Gly Ser Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Leu Met Glu Leu		
905	910	915
Arg Phe Leu Cys Met Asp Ser Ala Leu Arg Val Pro Val Gln Glu		
920	925	930
Glu Leu Cys Gly Leu Ala Ser Lys Pro Gly Ser Arg Arg Glu Val		
935	940	945
Cys Gln Ala Val Pro Cys Pro Ala Arg Trp Gln Tyr Lys Leu Ala		
950	955	960
Ala Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val Val Arg Arg Ile Leu		
965	970	975
Tyr Cys Ala Arg Ala His Gly Glu Asp Asp Gly Glu Glu Ile Leu		
980	985	990
Leu Asp Thr Gln Cys Gln Gly Leu Pro Arg Pro Glu Pro Gln Glu		
995	1000	1005
Ala Cys Ser Leu Glu Pro Cys Pro Pro Arg Trp Lys Val Met Ser		
1010	1015	1020
Leu Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Leu Gly Thr Ala Arg Arg		
1025	1030	1035
Ser Val Ala Cys Val Gln Leu Asp Gln Gly Gln Asp Val Glu Val		
1040	1045	1050
Asp Glu Ala Ala Cys Ala Ala Leu Val Arg Pro Glu Ala Ser Val		
1055	1060	1065
Pro Cys Leu Ile Ala Asp Cys Thr Tyr Arg Trp His Val Gly Thr		
1070	1075	1080
Trp Met Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Asp Gly Ile Gln Arg Arg		
1085	1090	1095
Arg Asp Thr Cys Leu Gly Pro Gln Ala Gln Ala Pro Val Pro Ala		
1100	1105	1110

Asp Phe Cys Gln His Leu Pro Lys Pro Val Thr Val Arg Gly Cys
1115 1120 1125

Trp Ala Gly Pro Cys Val Gly Gln Gly Thr Pro Ser Leu Val Pro
1130 1135 1140

His Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr Thr Ala Thr Pro Ala
1145 1150 1155

Gly Ala Ser Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg Gly Leu Leu Phe Ser
1160 1165 1170

Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln Glu Asn
1175 1180 1185

Ser Val Gln Ser Ser Ala Cys Gly Arg Gln His Leu Glu Pro Thr
1190 1195 1200

Gly Thr Ile Asp Met Arg Gly Pro Gly Gln Ala Asp Cys Ala Val
1205 1210 1215

Ala Ile Gly Arg Pro Leu Gly Glu Val Val Thr Leu Arg Val Leu
1220 1225 1230

Glu Ser Ser Leu Asn Cys Ser Ala Gly Asp Met Leu Leu Leu Trp
1235 1240 1245

Gly Arg Leu Thr Trp Arg Lys Met Cys Arg Lys Leu Leu Asp Met
1250 1255 1260

Thr Phe Ser Ser Lys Thr Asn Thr Leu Val Val Arg Gln Arg Cys
1265 1270 1275

Gly Arg Pro Gly Gly Gly Val Leu Leu Arg Tyr Gly Ser Gln Leu
1280 1285 1290

Ala Pro Glu Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met Gln Leu Phe Gly
1295 1300 1305

Pro Trp Gly Glu Ile Val Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ala Thr Ser
1310 1315 1320

Asn Ala Gly Gly Cys Arg Leu Phe Ile Asn Val Ala Pro His Ala

1325 1330 1335

Arg Ile Ala Ile His Ala Leu Ala Thr Asn Met Gly Ala Gly Thr

1340 1345 1350

Glu Gly Ala Asn Ala Ser Tyr Ile Leu Ile Arg Asp Thr His Ser

1355 1360 1365

Leu Arg Thr Thr Ala Phe His Gly Gln Gln Val Leu Tyr Trp Glu

1370 1375 1380

Ser Glu Ser Ser Gln Ala Glu Met Glu Phe Ser Glu Gly Phe Leu

1385 1390 1395

Lys Ala Gln Ala Ser Leu Arg Gly Gln Tyr Trp Thr Leu Gln Ser

1400 1405 1410

Trp Val Pro Glu Met Gln Asp Pro Gln Ser Trp Lys Gly Lys Glu

1415 1420 1425

Gly Thr

1427

<210>2

<211>22

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Phe Ser Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln

1 5 10 15

Glu Asn Ser Val Gln Ser Ser

20

<210>3

<211>18

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>3

Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile Trp Gly Pro Leu

1 5 10 15

Gln Glu Asp

<210>4

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>4

ctggagcacg acggcgcgcc cggcagcggc 30

<210>5

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>5

atgtgcaaca ctcaggcctg cgagaagacc 30

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>6

ccaacctgac cagtgtctac attgccaacc 30

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>7

ctggagccct gccacctag g

21

<210>8

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>8

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt cgtccacac gcagcgcgc 60
cg 62

<210>9

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>9

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatg tccttgtagt cgcgccatg cactgctgct 60
at 62

<210>10

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>10

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt cttgcgacat gaactccagc 60
tg 62

<210>11

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>11

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt ccagggtggg ggtaactgtc 60
ag 62

<210>12

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>12

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt ccacccaggc ctgccgtggc 60
tt 62

<210>13

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>13

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt cgtagggagg gcagggttcg 60
ag 62

<210>14

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>14

tccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt ccctggcagg gcagggctgg 60
gg 62

<210>15

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>15

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt ccacgtgtgc agcttgagcc 60
cc 62

<210>16

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>16

gccgtcgact cttatcactt atcgatcatcg tccttgtagt ccctaggtgg gcagggctcc 60
ag 62

<210>17

<211>62

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>17

gccgtcgact cttatcactt atcgtcatcg tccttgtagt caccctgtcc cacacagggc 60
cc 62

<210>18

<211>60

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>18

tccaagcttg tcgactctta tcacttatcg tcctgcctct tgtagtcggt tccttccttt 60

<210>19

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400>19

gactacaagg acgatgacga taagtga 27

<210>20

<211>8

<212>RPT

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400>20

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/02, C12N9/64, C12N5/10, C07K16/40, C12P21/08,
A61K38/43, A61K39/395, A61P7/02, G01N33/532, G01N33/573,
G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/02, C12N9/64, C12N5/10, C07K16/40, C12P21/08,
A61K38/43, A61K39/395, A61P7/02, G01N33/532, G01N33/573,
G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJIMURA Y. et al., Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome., Int.J. Hematol., (January 2002), Vol.75, No.1, pages 25 to 34	1-33
X	CAL S. et al., Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains., Gene., (January 2002), Vol.283, No.1-2, pages 49 to 62	1-33
P,X	WO 02/88366 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 07 November, 2002 (07.11.02), Full text & JP 2003-284570 A	1-33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2003 (27.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12280

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHUNG DW. et al., Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13., Biochemistry. (2002), Vol.41, No.37, pages 11065 to 11070	1-33
A	Osamu KANEMITSU, "Kotai Kogaku Nyumon", (Chijinshokan Co., Ltd.), 25 January, 1994 (25.01.94), pages 195 to 204, 145 to 166, 115 to 124	11-12/14/15, 19,25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12280

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 29 relate to an anti-ADAMTS-13 antibody. In contrast, the inventions according to claims 30 to 33 relate to a drug containing ADAMTS-13.

Although the technical matter common to these inventions resides in ADAMTS-13, ADAMTS-13 had been publicly known as reported by the following document. Thus, these inventions do not comply with the requirement of unity.

(It is recognized that the inventions of the present case are composed of two groups of inventions, i.e., those according to claims 1 to 29 and those according to claims 30 to 33.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/02, C12N 9/64, C12N 5/10, C07K 16/40, C12P 21/08, A61K 38/43, A61K 39/395, A61P 7/02, G01N 33/532, G01N 33/573, G01N 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/02, C12N 9/64, C12N 5/10, C07K 16/40, C12P 21/08, A61K 38/43, A61K 39/395, A61P 7/02, G01N 33/532, G01N 33/573, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	FUJIMURA Y. et al., Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. Int J Hematol. (Jan. 2002) Vol. 75, No. 1, p. 25-34	1-33
X	CAL S. et al., Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. Gene. (Jan. 2002) Vol. 283, No. 1-2, p. 49-62	1-33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



4 N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 02/88366 A1(財団法人化学及血清療法研究所)2002. 11. 07, 全文 & JP 2003-284570 A	1 - 33
P, X	CHUNG DW. et al., Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13. Biochemistry. (2002) Vol. 41, No. 37, p. 11065-11070	1 - 33
A	金光修、抗体工学入門 (地人書館)、1994年1月25日発行、 第195-204頁/第145-166頁/第115-124頁	11-12 /14/1 5, 19, 2 5-27

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-29に係る発明は、抗ADAMTS-13抗体に係るものである。
これに対して、請求の範囲30-33に係る発明は、ADAMTS-13を含有する医薬に係るものである。
両発明に共通する技術的事項は、ADAMTS-13であるが、ADAMTS-13は、後に挙げる文献により公知であるから、両者は単一性を満たさない。
（本願発明は、請求項1-29、及び、請求項30-33の二発明群からなると認める。）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。